



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Desarrollo de una plataforma para la selección de anticuerpos
recombinantes humanos basada en la activación de linfocitos T.
*Estrategias de selección *in vitro* e *in vivo*.*

Memoria presentada por VANESA ALONSO CAMINO para optar al grado de
doctora por la Universidad Autónoma de Madrid en el programa de Biología
Molecular

Director: Dr. Luís Álvarez Vallina

Hospital Universitario Puerta de Hierro

Madrid, Julio 2011

El Dr. LUIS ÁLVAREZ VALLINA, Jefe Adjunto del Servicio de Inmunología y Jefe de la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid.

CERTIFICA

Que el trabajo titulado **Desarrollo de una plataforma para la selección de anticuerpos recombinantes humanos basada en la activación de linfocitos T. Estrategias de selección *in vitro* e *in vivo*** que presenta VANESA ALONSO CAMINO para la obtención del GRADO DE DOCTOR por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado bajo mi dirección en la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid y reúne las condiciones de calidad, contenido y formales exigibles para ser presentado ante el tribunal correspondiente. Para que conste a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Madrid a 23 de mayo de 2011.

Para que conste a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Madrid a 23 de mayo de 2011.



VºBº del director de tesis
Dr. Luis Álvarez Vallina

VºBº del tutor
Dr. Juan Miguel Redondo Moya

Esta Tesis Doctoral, realizada en la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro, ha sido financiada por la Fundación Mutua Madrileña, el Ministerio Ciencia y Tecnología (BIO2005-04794), la Comunidad Autónoma de Madrid (S-BIO-0236-2006) y la Unión Europea, Programa de Cooperación Territorial (IMUNONET-SOE1/PI/E014).

Vanesa Alonso Camino ha disfrutado de una *beca de formación de personal investigador* del Gobierno Vasco (BF107.132).

RESUMEN

DEVELOPMENT OF A NOVEL ANTIBODY SELECTION PLATFORM BASED ON T CELL ACTIVATION. *IN VITRO* AND *IN VIVO* SELECTION STRATEGIES.

In this work, we describe the design and testing of a mammalian cell surface display platform in T lymphocytes. The display of antibodies on the surface of T lymphocytes, as a part of a chimeric antigen receptor (CAR) mediating signaling, may ideally link the antigen-antibody interaction to a demonstrable change in T cell phenotype, due to subsequent expression of the early T cell activation marker CD69. In this proof-of-concept, an *in vitro* selection was carried out using a human T cell line lentiviral-transduced to express a tumor-specific CAR on the surface. Based on an effective interaction between the CAR and the tumor-associated antigen, we demonstrated that combining CAR-mediated activation with FACS sorting of CD69+EGFP+ T cells, it is possible to isolate binders to tumor specific cell surface antigen.

The display of a scFv antibody repertoire on the T cell surface in a CAR context allowed us to select tumor-specific antibodies *in vitro*. This lymphocyte display platform might allow us to perform effective selection of antibodies *in vivo* as consequence of the process of lymphocyte extravasation, mediated by cellular adhesion molecules, and as a consequence of the process of T cell activation mediated by the CAR.

An animal model of human tumor angiogenesis was generated to both the study of molecular aspects in the angiogenic process and the evaluation of potential new antiangiogenic agents. Furthermore, we believe that the model can be useful to select human repertoires using the lymphocyte display platform.

A mi hermana Rebeca,
por ser el primer “momento más feliz de mi vida” que soy capaz recordar

AGRADECIMIENTOS

“Curiosa es nuestra situación de hijos de la Tierra. Estamos por una breve visita y no sabemos con qué fin, aunque a veces creemos presentirlo. Ante la vida cotidiana no es necesario reflexionar demasiado: Estamos para los demás. Ante todo para aquellos de cuya sonrisa y bienestar depende nuestra felicidad; pero también para tantos desconocidos a cuyo destino nos vincula una simpatía.”

Mi visión del mundo

Mein Weltbild

(Albert Einstein)

Este apartado de la tesis es el que más me ha costado empezar y redactar. Porque no se escribe con la razón, sino con el corazón. Es imposible plasmar en palabras lo que dice el corazón sin tener la sensación de que las palabras se quedan cortas a la hora de expresar los sentimientos. Es un apartado difícil, porque no sólo has de recapitular los años de tesis, y las personas que han ayudado de forma directa a que la misma sea posible, sino también todas aquellos años, personas y hechos que de forma indirecta han contribuido a la realización de esta tesis, porque fueron moldeando tu personalidad y tu vida hasta convertirte en lo que eres en el presente, lo que piensas, tus gustos y tus metas.

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Luis Álvarez Vallina, por confiar en mí y hacer posible mi sueño de dedicarme a la investigación. Por enseñarme a razonar, por sus críticas y correcciones, que me han permitido madurar en este trabajo. Pero sobre todo por hacer que no perdiese la fe en la ciencia y en mí misma en los momentos mas duros.

A Laura Sanz, por enseñarme prácticamente todas las técnicas y métodos que conozco en ciencia. Por su dedicación durante mi primer año de tesis y por toda la ayuda prestada en los años posteriores, siendo una persona siempre dispuesta a responder cualquier pregunta, echando mano sobre todo de su increíble archivo bibliográfico mental.

A mis grandes amigos del laboratorio, porque gracias a ellos esta etapa del camino de mi carrera científica será siempre para mí la más especial. Por estar ahí en las alegrías y en las penas y entender ambas mejor que nadie. Por enseñarme lo grande que es trabajar en equipo y lo que enriquece laboral y personalmente. A mi hermana Marta, por hacer realidad mi sueño imposible de tener una hermana mayor. Por compartir conmigo su sensatez, su paciencia, su trabajo, su talento y su amistad. Por ayudarme y encargarse siempre de mis experimentos en mi ausencia (los del pasado...y los que vendrán). Por todos esos momentos en los que no hemos necesitado más que mirarnos para entendernos, y reírnos sin parar. Para mí fue un regalo inesperado la oportunidad de volver a trabajar con ella en Rochester y nuevamente en Madrid. A Ángel (alias ACME) y a Fermín, por arrancarme tantas risas, por ser el alma del grupo, por su cariño, sus críticas constructivas, su sabiduría y por convertir el negro en el color más alegre (¡cuánto se le echa de menos!). A David Sánchez, porque empezamos a la vez esta aventura (y terminaremos a la vez), lo cual ha hecho que compartamos muchos momentos y

situaciones que han forjado una gran confianza y capacidad de entendimiento entre ambos. Ha sido un enorme placer y ayuda infinita trabajar, aprender y crecer a su lado. A Patricia, por su risa loca, su espíritu enérgico, por estar siempre más que dispuesta (y ofrecerse la primera) a ayudar en cualquier cosa. A Ana Álvarez de Cienfuegos, que llegó como un huracán a este laboratorio y en una semana se ganó el corazón de todo el grupo. Por su amistad dentro y fuera del laboratorio, su generosidad, su sinceridad y su falta de vergüenza ante cualquier situación. Por regalarme tantas risas y cariño. A Rodrigo, mi pequeño saltamontes, que me enseñó lo interesante y valioso que puede ser enseñar a alguien. Por compartir su sencillez, su tranquilidad y sus amplios conocimientos en los temas más insospechados (aún le sigo dando vueltas a lo del cableado submarino...). A Irene Guijarro, porque nunca había visto una persona capaz de reírse tanto y contagiar ese estado a los demás. Es una persona que crea un ambiente muy positivo y agradable allí donde va, además de tener muchas ganas y un gran talento para la ciencia. A Noelia una persona directa y crítica, que ofreció al grupo un punto de vista distinto. A Nuria, compañera de poyata en el último año, graciosa y que ameniza el día con su música y a Irene Molina, espontánea y todo energía, con las que he disfrutado el último año y con las que me hubiera gustado compartir más tiempo. A Ana Blanco, Emma y Elena, a las que no he tenido el tiempo suficiente de conocer por ser los miembros más recientes del grupo, pero que prometen ser grandes adquisiciones.

A compañeros que compartieron momentos más cortos pero intensos en el grupo: Marta Sánchez, loca donde las haya, María Rodríguez, persona muy válida que llegará muy lejos en este trabajo (y de una transparencia y sencillez envidiables) y Nanna, que nos enseñó que los nórdicos no tienen por qué ser serios.

A nuestros amigos del laboratorio vecino de Inmunología, David Ordóñez, todo un personaje de dos caras: la cómica y divertida, y la seria, increíblemente cariñosa y generosa. Un gran amigo. A Elisa, por todos esos momentos de risas inagotables con “Mochilo” y el resto de “Los Fruittis”. A Kelly, pequeñita pero matona, que nos ha hecho reír tanto descubriendo el español de España. A Manuela, persona seria y directa pero con una ironía y sentido del humor muy interesantes. A Lizet, que estuvo poco tiempo pero que siempre será nuestra amiga al otro lado del charco. A Tito, brillante, con mucho talento y extremadamente divertido.

A la panda de Oncología Médica, aparte de por la ayuda y colaboración científica, porque no he pasado una sola vez por ese laboratorio sin reírme de alguna de sus ocurrencias. Javi y sus bailecitos, Bea (perfecto dúo con Irene Guijarro si te quieres divertir), José Miguel, Vanesa, Cristina, Irene, Gemma, Mercedes, Alberto, Marta, Yolanda, Coral, Raquel y por supuesto al cabeza de este fantástico grupo, Félix Bonilla.

A Antonio Sánchez (que dice que nació en Málaga, pero no podría ser más madrileño), a la inestimable ayuda de la gente de Anatomía Patológica (en especial Carmen Bellas, Paloma, César, Linah y M^a Jesús) y de Radiofísica (en especial M^a Carmen Ispizua), fundamentales para los trabajos *in vivo*.

A Richard Vile, por acogerme en su laboratorio en la *Mayo Clinic*, su ayuda y disposición. A toda la gente de su grupo, Phonphimon, Karen, Diana y en especial por su ayuda y paciencia a Memy, Jill y Tim. Y a ese extraño chihuahua perdido que se paseaba por la Mayo y que tanto nos hizo reír a Marta y mí. Y a todas las personas que conocí en Rochester y que hicieron que el *Middle West* se convirtiese el lugar más divertido del mundo, en especial a mi querida y guapísima Amaia, a Tim, Mimi, Rajesh, James y Kamutu.

Por supuesto a mi familia. A mis padres, Julio y M^a Isabel, porque no sólo me dieron la vida, sino todo lo que soy. Porque aunque no entiendan esta tesis, se la debo a ellos más que a nadie, por ponerme delante todos los medios necesarios aunque supusiese un gran esfuerzo económico y personal.

A mi hermana Rebeca, gracias por ser mi compañera de juegos, mi muñequita, mi vida. Tengo que darle las gracias a la vez que pedirle perdón, por no haber estado con ella todo lo que me hubiera gustado por seguir mi sueño de dedicarme a la investigación. Es por eso que esta tesis está dedicada a ella sin lugar a dudas, porque es el primer fruto de ese precio que hemos tenido que pagar.

A mi familia postiza, mi “mama Obdulia”, por ser mi tercera abuela y darme un amor incondicional. A Pili y Manolo, que cuidaron tanto de mí, lo hacen y lo seguirán haciendo siempre.

A mi prima María José, que por poco que nos veamos, siempre está en mi corazón. Por ser además mi amiga y confidente.

A todos aquellos que ya no están, pero que formarán siempre parte de mi. A mi amiga Natalia, que se fue con tan sólo 6 añitos, llevándose con ella la piedra que haría tambalearse a los pilares de mi fe. A mi bisabuela Nina, que fue para mí un símbolo del amor, la bondad y dedicación. A tete, que me quiso con locura y al que siempre querré de igual manera. A mi abuelo Julián, que me transmitió el amor y la pasión por la naturaleza y que de haber vivido en otros tiempos estoy segura de que hubiera sido biólogo. A mi abuela Justa, porque después de 4 años sin ti me he dado cuenta de que no pasará un solo día de mi vida sin que te eche de menos. Me siento orgullosa de ser tu nieta y puedo decir que no habrá nadie en este mundo que te haya conocido sin quererte. A tite, mi tite. Para el no encuentro palabras. Sólo puedo decir que con total seguridad hubiera sido la persona que más orgullosa habría sostenido este libro entre sus manos.

A los mejores amigos que uno puede tener. Por todos estos años en Madrid, en los que hemos crecido juntos y hemos compartido nuestras vidas desde los días del Santa Engracia´s clan. A Joan, que ha sido un pilar fundamental, ha estado ahí siempre que lo he necesitado y me ha ayudado en todos esos momentos de debilidad que tiene todo aquel que se dedica a la ciencia. Porque será siempre un amigo muy especial, independientemente de lo lejos que estemos. A Eli, otra hermana postiza, que espero acabe conmigo en la “costa oeste”, porque no sé lo que voy a hacer allí sin ella. Por ser tan cariñosa, honesta, sensible y tan buena amiga. Después de todas las prácticas y trabajos juntas en la universidad, fue una enorme ilusión y alegría poder trabajar en un proyecto científico real juntas. A Benet, por ser el único capaz de hacerme reír hasta que me duelen los músculos abdominales. Por ser un ejemplo de dedicación y constancia en los proyectos que tiene entre manos, tanto personales como profesionales, que estoy segura que le harán llegar lejos, sea cual sea el camino que tome (sobre todo en lo que respecta a esa empresa que nos dará la gloria y fama). Porque como el dijo, esto no acaba aquí en Madrid, nuestras aventuras juntos no acaban más que empezar. A Melissa, por su espíritu indomable, su humor negro, su aplastante y divertidísima sinceridad, su risa “silenciosa”, por demostrarme que la verdadera amistad es aquella en la que a pesar de la distancia, la confianza y cariño van en aumento. Por ser mi amiga. A Fadi, por cuidar de mi niña. A Mariam, un espíritu crítico e inteligencia científica sorprendentes. Por

compartir la impulsividad y espontaneidad que a mi me faltan y ser una gran amiga. A Luis, por hacer extremadamente feliz a mi amiga. A Fernando, por transmitir esa paz y tranquilidad ante cualquier situación y por esos años divertidos en Santa Engracia. A Sabrina, su elegancia y sus locuras.

A los múltiples compañeros de piso distintos que he tenido tras el Santa Engracia's clan, en especial Ismael, Olivier y Omar, por los buenos momentos que hemos pasado.

A Eneritz, por su fidelidad y su amistad durante tantos años.

Y a Marc, por tu ayuda fundamental en la dura etapa final de la tesis, por animarme a luchar, por enseñarme a ser paciente, por transmitirme tu energía, tu pasión por la vida, por ser tan divertido, por enseñarme el *bright side* de las cosas. Por tu amor. Por dejarlo todo por mí. Por ser tan especial. Por hacerme feliz. Porque la tristeza de terminar esta etapa tan importante de mi vida y separarme de tantas personas importantes para mí, sólo se disuelve ante la ilusión de una nueva etapa a tu lado. Porque no puedo esperar para empezar a hacer realidad todos esos sueños que tenemos, hacerlos realidad juntos.

ÍNDICE

ÍNDICE	21
CLAVE DE ABREVIATURAS	29
INTRODUCCIÓN	35
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANTICUERPOS.....	37
1.1. Estructura y función.....	37
2. ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	39
2.1. Generación de anticuerpos monoclonales <i>in vivo</i>	39
3. INGENIERÍA DE ANTICUERPOS: ANTICUERPOS MONOCLONALES DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	42
3.1. Anticuerpos monoclonales quiméricos.....	42
3.2. Anticuerpos monoclonales humanizados.....	42
3.3. Fragmentos de anticuerpos.....	43
4. TECNOLOGÍAS DE SELECCIÓN DE ANTICUERPOS A PARTIR DE REPERTORIOS O GENOTECAS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES.....	45
4.1. Plataformas virales.....	45
4.1.1. Plataformas basadas en bacteriófagos.....	45
4.1.2. Plataformas basadas en virus de células eucariotas.....	49
4.2. Plataformas basadas en células microbianas.....	49
4.3. Plataformas basadas en células de mamífero.....	49
4.4. Otras plataformas de selección.....	50
4.5. Selección <i>in vivo</i> de anticuerpos.....	50
5. INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL DE BASE CELULAR.....	51
5.1 Reconocimiento del antígeno y activación del linfocito T.....	51
5.2 Estrategias basadas en receptores TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$: transferencia adoptiva de linfocitos infiltrantes del tumor.....	54
5.3 Estrategias basadas en receptores quiméricos.....	55
OBJETIVOS	59
MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. LÍNEAS CELULARES.....	65
2. CÉLULAS PRIMARIAS.....	66
3. MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE CELULAR CON EL HAPTENO NIP.....	66
4. CONSTRUCCIONES GÉNICAS.....	66

5. GENERACIÓN DE REPERTORIOS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES	
HUMANOS EN VECTORES LENTIVIRALES.....	71
5.1. Repertorio derivado de la genoteca de scFvs humanos Griffin.1.....	72
5.2. Repertorio derivado de la genoteca de scFvs humanos Tomlinson I+J.....	73
5.3. Repertorio derivado de la genoteca de anticuerpos monodominio humanos (Repertorio DAb)	74
6. GENERACIÓN Y TITULACIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES.....	75
7. MODIFICACIÓN GENÉTICA DE CÉLULAS HUMANAS.....	76
7.1. Transfecciones.....	76
7.2. Transducciones.....	76
8. CITOMETRÍA DE FLUJO (CF).....	76
9. ESTUDIOS FUNCIONALES.....	77
9.1. Ensayos de activación de células T.....	77
9.1.1. Ensayos de activación con proteínas purificadas.....	77
9.1.2. Ensayos de activación con células diana.....	77
9.1.2.1. Ensayos a de activación a pequeña escala.....	77
9.1.2.2. Ensayos a de activación a media escala.....	78
9.2. Ensayos a de activación-selección con células diana.....	78
10. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	79
10.1. Estudios de <i>fingerprinting</i>	79
10.2. Estudios de secuenciación.....	79
11. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	79
12. ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS EN FASE SÓLIDA (ELISA)	80
12.1. ELISA para la titulación de partículas lentivirales.....	80
12.2. ELISA para la detección y cuantificación de interleuquina-2.....	80
12.3. ELISA para la detección de anticuerpos funcionales.....	81
12.3.1. ELISA con proteína purificada.....	81
12.3.2. ELISA con células diana fijadas.....	81
13. TRANSFERENCIA <i>WESTERN</i>	82
14. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	82
14.1. Anestesia.....	82
14.2. Irradiación de los animales	83
14.3. Ensayos de implantación tumoral: xenotransplante convencional.....	83
14.4. Ensayos de implantación tumoral: xenotransplante humanizado.....	83

14.5. Ensayos de imagen molecular	84
14.6. Selección <i>in vivo</i> de anticuerpos recombinantes.....	84
14.6.1. Inoculación intravenosa.....	85
14.6.2. Inoculación intracardiaca.....	85
14.6.3. Inoculación intratumoral.....	85
14.6.4. Recuperación y caracterización de las células seleccionadas.....	85
15. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.....	86
15.1 Análisis del origen vascular por inmunohistoquímica.....	86
15.2 Análisis de la densidad vascular.....	86

RESULTADOS **89**

1. DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UNA PLATAFORMA DE SELECCIÓN DE ANTICUERPOS BASADA EN LA ACTIVACIÓN CÉLULAR DE LINFOCITOS T.....	91
1.1 Diseño de construcciones génicas para la expresión de receptores quiméricos de activación (CAR)	91
1.1.1. Construcción de un vector lentiviral que codifica un CAR con especificidad antitumoral.....	91
1.1.2. Transducción de una línea celular T humana con un vector lentiviral que codifica un CAR con especificidad antitumoral.....	93
1.1.2.1. Expresión en la superficie celular.....	94
1.1.2.2. Activación celular mediada por la ocupación del CAR.....	94
1.1.3. Generación de una población de células T que expresan un CAR no tumor específico.....	94
1.2. Expresión de marcadores tempranos de activación mediada por la ocupación del CAR.....	95
1.3. Activación de las células T que expresan un CAR con especificidad antitumoral en presencia de poblaciones de células T competidoras que no expresan CAR (CAR ⁻).....	97
1.4. Selección de células T que expresan un CAR con especificidad antitumoral a partir de mezclas con células T competidores (CAR ⁻ o células T que expresan un CAR no tumor-específico)	98
1.4.1. Caracterización funcional y fenotípica de la población seleccionada.....	100
1.4.2. Caracterización molecular de la población seleccionada.....	101

2. SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES HUMANOS MEDIANTE LA PLATAFORMA DE SELECCIÓN DE ANTICUERPOS EN LINFOCITOS T (<i>Plataforma SALT</i>)	101
2.1 Construcción de vectores lentivirales que codifican repertorios de anticuerpos recombinantes humanos en formato CAR (<i>Genotecas SALT</i>).....	102
2.1.1. Repertorio Griffin.1.....	102
2.1.2. Repertorio Tomlinson.....	103
2.2. Transducción de células T humanas para la expresión del repertorio de anticuerpos en formato CAR.....	104
2.2.1. Activación de células T que expresan CARs derivados del repertorio Griffin.1.....	104
2.3. Selección <i>in vitro</i> de anticuerpos recombinantes humanos frente a antígenos expresados en la superficie tumoral mediante la plataforma SALT.....	106
2.3.1. Caracterización fenotípica y funcional.....	107
2.3.2. Caracterización molecular de las poblaciones seleccionadas.....	108
2.3.2.1. Estudio de diversidad clonal.....	108
2.3.2.2. Expresión y purificación de los anticuerpos seleccionados.....	111
2.3.2.3. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos seleccionados.....	113
2.4. Evaluación de los anticuerpos seleccionados (<i>CARbodies</i>) en el contexto de un CAR multisegmento.....	115
2.4.1. Optimización de los CAR.....	115
2.4.2. Construcción de un vector lentiviral que codifica un CAR multisegmento (CARv1)	115
2.4.3. Transducción de una línea celular T humana con un vector lentiviral que codifica un CARv1 multisegmento, con especificidad antitumoral.....	117
2.4.3.1. Caracterización fenotípica y funcional.....	117
2.4.4. Construcción de los vectores lentivirales que codifican para los anticuerpos seleccionados (<i>CARbodies</i>) en formato CARv1.....	118
2.4.4.1. Transducción de células T.....	119
2.4.4.2. Evaluación de la funcionalidad y la especificidad de los anticuerpos seleccionados (<i>CARbodies</i>) en formato CARv1.....	120
3. SELECCIÓN <i>IN VIVO</i> DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES HUMANOS MEDIANTE LA <i>Plataforma SALT</i>	122

3.1. Construcción de vectores lentivirales que codifican repertorios de anticuerpos humanos monodominio (V _H) en formato CAR (<i>Genoteca SALT^{VH}</i>).....	122
3.2. Transducción de células T humanas para la expresión del repertorio. Caracterización fenotípica de la población obtenida.....	122
3.3. Selección de anticuerpos <i>in vivo</i> de repertorios de anticuerpos V _H en formato CAR, en ratones portadores de tumor de origen humano.....	124
3.3.1. Inoculación vía intravenosa del repertorio V _H	125
3.3.2. Inoculación vía intracardiaca del repertorio V _H	126
3.3.3. Inoculación vía intratumoral del repertorio V _H	127
4. GENERACIÓN DE UN MODELO TUMORAL CON VASCULATURA HUMANA PARA LA SELECCIÓN <i>IN VIVO</i> DE ANTICUERPOS.....	131
4.1 Diseño de construcciones génicas para la expresión del gen de la Luciferasa en células endoteliales humanas.....	131
4.1.1. Construcción del vector lentiviral que codifica para el gen de la luciferasa de <i>Photinus pyralis</i>	131
4.1.2. Transducción de células endoteliales humanas primarias. Caracterización fenotípica.....	132
4.2. Establecimiento de implantes tumorales con vasculatura humana.....	133
4.3. Estudio del origen humano o murino de la vasculatura.....	134
4.4. Efecto de la irradiación sobre el crecimiento tumoral y la vasculatura.....	135
4.4.1. Irradiación localizada e irradiación general subletal y establecimiento de los implantes tumorales-vasculares.....	135
4.4.2 Estudio del origen humano o murino de la vasculatura.....	139
DISCUSIÓN	141
1. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES: ¿ALTA COSTURA O <i>PRÊT-À-PORTER</i> ?.....	143
2. PLATAFORMA SALT: UN GRAN “SALTO” EN LA SELECCIÓN DE REPERTORIOS.....	147
4. SELECCIÓN <i>IN VIVO</i> DE ANTICUERPOS: NUEVOS MODELOS ANIMALES.....	152
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	159
ANEXOS	175

ANEXO I: RELACIÓN DE CLONES REPRESENTATIVOS DE CADA GENOTECA.....	177
ANEXO II: ARTÍCULOS PUBLICADOS, PATENTES Y MODELOS DE UTILIDAD.....	185

CLAVE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AICD	Muerte celular inducida por activación, del inglés <i>activation-induced cell death</i>
Ac	Anticuerpo
AcHz	Anticuerpo Humanizado
AcMo	Anticuerpo Monoclonal
AcQ	Anticuerpo Quimérico
AcR	Anticuerpo Recombinante
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, del inglés <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
Ag	Antígeno
BCR	Receptor de antígeno de células B, del inglés <i>B cell receptor</i>
BLI	Bioluminiscencia
BSA	Seroalbúmina bovina
CAR	Receptor de antígeno quimérico, del inglés <i>Chimeric Antigen Receptors</i>
CDC	Citotoxicidad mediada por Complemento del inglés <i>complement-dependent cytotoxicity</i>
CDRs	Regiones determinantes de complementariedad o regiones hipervariables, del inglés <i>complementarity determining regions</i>
CEA	Antígeno carcinoembrionario, del inglés <i>carcinoembryonic antigen</i>
C _H	Dominio constante de la cadena pesada
C _L	Dominio constante de la cadena ligera
CF	Citometría de flujo

Dab	Anticuerpo monodominio
EC	Célula endotelial, del inglés <i>Endothelial cells</i>
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida, del inglés <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EGFP	Proteína verde fluorescente, del inglés <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
Fab	Fracción de la inmunoglobulina que contiene la cadena ligera y los dominios V _H y C _{H1} de la cadena pesada. Es la responsable de la unión al antígeno (<i>antigen binding</i>)
Fc	Fracción cristizable. Porción de la inmunoglobulina formada por las cadenas pesadas (salvo el dominio C _{H1}) de la que dependen sus funciones efectoras
FcR	Receptor para la porción Fc
FITC	Fluoresceína
FR	Regiones marco o entramado, del inglés <i>Framework Regions</i>
HAC	Cromosoma artificial humano, del inglés <i>Human artificial chromosome</i>
HACA	Respuestas inmunes dirigidas frente a los AcQs del inglés <i>Human Anti-Chimeric Antibodies</i>
HAHA	Respuestas inmunes dirigidas frente a los AcHzs, del inglés <i>Human Anti-Humanized Antibodies</i>
HAMA	Respuestas inmunes dirigidas frente a las inmunoglobulina murinas, del inglés <i>Human Anti-Mouse antibodies</i>
HAT	Hipoxantina, aminopterina y timidina
hFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos humano, del inglés <i>Human Fibroblasts Growth Factor</i>
HGPRT	Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa
HRP	Peroxidasa de rábano, del inglés <i>Horseradish Peroxidase</i>
i.c.	Intracardiaca
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta

Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IMAC	Columna de afinidad de iones metálicos inmovilizados, del inglés <i>Immobilised Metal Affinity Chromatography</i>
i.p.	Intraperitoneal
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
i.t.	Intratumoral
i.v.	Intravenosa
LPD	Leche en polvo desnatada
MDI	Multiplicidad de infección
MFI	Intensidad media de fluorescencia, del inglés <i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad, del inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MSC	Células madre mesenquimales, del inglés <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NIP	4-hidroxi, 3-nitro, 5-iodofenilacetil
OPD	dihidrocloreto de O-fenilenediamina, del inglés <i>o-Phenylenediamine dihydrochloride</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> .
PE	Ficoeritrina
PEG	Polietilenglicol
PP	Partículas físicas
SALT	Selección de anticuerpos en linfocitos T
s.c.	Subcutáneo
scFv	Fragmento variable de cadena única, del inglés <i>Single Chain Fragment Variable</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

TAA	Antígeno asociado a tumor, del inglés <i>Tumor-Associated Antigen</i>
TCR	Receptor de antígeno de células T, del inglés <i>T Cell Receptor</i>
TIL	Linfocitos T infiltrantes del tumor, del inglés <i>Tumor-Infiltrating Lymphocytes</i>
TK	Timidina quinasa, del inglés <i>Thymidine kinase</i>
TPPF	Tecnología de Presentación de Péptidos y proteínas en la superficie de Fagos Filamentosos
TSA	Antígeno específico de tumor, del inglés <i>Tumor-Specific Antigen</i>
VEGF	Factor de crecimiento del endotelial vascular, del inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
V _H	Región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina, del inglés <i>Variable Heavy</i>
V _L	Región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina, del inglés <i>Variable Light</i>
YAC	Cromosoma artificial de levaduras, del inglés <i>Yeast Artificial Chromosome</i>

INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANTICUERPOS

1.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El sistema inmune permite al huésped disponer de células y moléculas extraordinariamente específicas para las múltiples sustancias patógenas o antígenos (Ag) presentes en el medio ambiente. Todos los componentes del sistema inmunitario actúan de forma coordinada para combatir los “desafíos antigénicos”, desarrollando respuestas frente a ellos. Los anticuerpos (Acs) o inmunoglobulinas (Igs) son los efectores de la rama humoral del sistema inmune adaptativo. Los Acs pueden encontrarse de forma soluble, como moléculas circulantes secretadas por las células plasmáticas procedentes de la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B (Fagraeus, 1948). Pero también pueden estar presentes en la membrana de las células B, funcionando como la parte específica del denominado complejo receptor de Ag de las células B (BCR, del inglés *B Cell Receptor*).

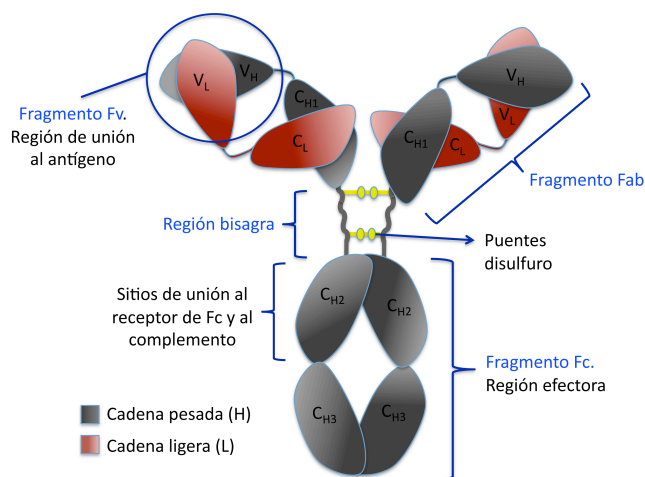


Figura 1. Estructura de una molécula de IgG humana. Una IgG está formada por dos cadenas pesadas (H) unidas por puentes disulfuro y dos cadenas ligeras (L) unidas a las cadenas H por uniones covalentes y no covalentes. Contiene dos zonas variables (cada una compuesta por una región VH y una VL), que confieren la especificidad de unión. El fragmento Fc es la región efectora de la IgG encargada de activar el complemento y de unirse a diferentes tipos celulares.

Los Acs poseen una estructura básica simétrica (Figura 1), con un peso molecular aproximado de 150 kDa. Cada molécula está compuesta por dos cadenas polipeptídicas pesadas (cadenas H, del inglés *heavy*) idénticas, de peso molecular entre 55 y 70 kDa, unidas entre sí por puentes disulfuro, y dos cadenas ligeras (cadenas L, del inglés *light*), de 25 kDa, igualmente idénticas entre sí, que se unen individualmente a cada una de las cadenas H mediante interacciones covalentes y no covalentes (Edelman, 1959). Tanto las cadenas H como las cadenas L están formadas por dominios estructurales de aproximadamente 110 aminoácidos, conocidos como “plegamientos o dominios de Ig”. Cada uno de estos dominios Ig presenta un puente disulfuro intracatenario esencial para

el plegamiento y la funcionalidad de la molécula. Existen 2 tipos de cadenas L: kappa (κ) y lambda (λ); y cinco tipos de cadenas H: mu (μ), delta (δ), gamma (γ), alfa (α) y epsilon (ϵ). Su combinación da lugar a las cinco clases de Igs existentes: IgM, IgD, IgG, IgA y IgE, respectivamente. Las cadenas H y L se componen de regiones aminoterminales variables (V) y de regiones carboxiterminales constantes (C). Cada cadena H está formada por un dominio variable amino terminal (V_H) y tres (o cuatro en el caso de las IgM e IgE) dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4}). Por su parte, cada cadena L está formada por dos dominios, uno variable amino terminal (V_L) y otro constante (C_L) (Figura 1).

Dentro de cada molécula de Ac podemos diferenciar el fragmento Fab (del inglés *Fragment Antigen-binding*, Fragmento de unión al Ag) compuesto a su vez por la cadena L unida a los dominios V_H y C_{H1} de la cadena H; el fragmento Fc (del inglés *crystallizable Fragment*, Fragmento cristalizante) formado por la asociación de los otros dominios C_H de ambas cadenas H; y una segmento polipeptídico flexible (región bisagra) que une los fragmentos anteriores y confiere a la molécula una forma similar a una “Y” (Fagraeus, 1948; Porter, 1959; Edelman, 1991) (Figura 1). Los puentes disulfuro que unen ambas cadenas H se forman a nivel de la región bisagra, confiriéndoles gran flexibilidad y permitiendo la unión a diferentes estructuras antigénicas. El fragmento Fc es responsable de las funciones efectoras: interacción con factores del complemento (CDC, del inglés *complement-dependent cytotoxicity*), opsonización, citotoxicidad celular dependiente de Ac (ADCC, del inglés *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), etc., además del anclaje de la molécula de Ig en la membrana celular a través de los receptores para la porción Fc de la Ig ($Fc\gamma R$, $Fc\epsilon R$, $Fc\alpha R$) (Kim *et al*, 2005). Dentro del fragmento Fab se encuentra la región de unión Ag (Fragmento Fv) formada por las regiones V de las cadenas H y L. Cada molécula de Ac es bivalente y monoespecífica, tiene dos sitios de unión frente al mismo Ag. Estas regiones de unión al Ag presentan una gran variabilidad de secuencia y determinan su especificidad. El centro de unión al Ag está constituido por tres segmentos no colineales, pertenecientes al dominio V_H , y tres al dominio V_L , que se juxtaponen para formar una superficie o cavidad (parátipo) donde se aloja la región del Ag reconocida por el Ac (epítipo). Estos seis segmentos se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDRs, del inglés *complementarity determining regions*) o regiones hipervariables (Brekke & Sandlie, 2003). Las CDRs (CDR 1 a 3 de las cadenas H o L) se encuentran flanqueadas por 1-4 regiones marco (FR, del inglés *Framework Regions*) altamente conservadas.

Una de las características fundamentales del sistema inmune es su capacidad para generar millones de Acs diferentes que reconocen específicamente una amplia variedad de Ags, independientemente de su origen (Landsteiner, 1945). Esto es debido a la particular organización y reordenamiento de los genes de las Igs. Al contrario de lo que ocurre en cualquier otra proteína, donde normalmente un único gen controla la síntesis de una cadena peptídica, los genes de las regiones V de los Acs se ensamblan a partir de un numeroso grupo de genes más pequeños separados por ADN no codificante. La cadena H contiene 65 genes V (variables), 27 genes D (del inglés *Diversity*) y 6 genes J (del inglés *functional joining*). Las cadenas L también poseen múltiples genes V y J, pero no D. Estos genes, expresados únicamente en los linfocitos B, sufren un proceso de reordenamiento somático al azar durante la maduración de los linfocitos B, que es responsable de la generación de diversidad que permite obtener un amplio repertorio de Acs (repertorio primario) estimado en más de 10^7 especificidades de unión diferentes, que generalmente muestran afinidades bajas. La afinidad de la interacción Ag-Ac se incrementa a lo largo de la evolución de la respuesta inmunitaria, a través un proceso conocido como “maduración de afinidad”. Esta maduración es el resultado de un proceso de hipermutación somática de los segmentos V reordenados y de la posterior selección por el Ag de aquellos mutantes con mayor afinidad (Yélamos, 2004; Hozumi & Tonegawa, 2004).

2. ANTICUERPOS MONOCLONALES

2.1. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES *IN VIVO*

Debido a que los Acs se han convertido en una herramienta fundamental en la investigación, tanto básica como aplicada, así como en los campos diagnóstico y terapéutico, durante décadas los investigadores han intentado recrear los mecanismos de generación de diversidad y de selección (Rojas *et al* 2004). Hasta el desarrollo de los Acs monoclonales (AcMos), el uso de los Acs con fines diagnósticos y/o terapéuticos se centraba únicamente en la utilización de antisueros. Estos antisueros se obtienen a partir de diferentes especies animales tras la inmunización repetida con el Ag de interés. Los antisueros contienen una mezcla de Acs procedentes de la activación de distintos clones de linfocitos B, por lo que también se denominan “Acs policlonales”. Estos “Acs policlonales” reconocen el Ag, con distinta especificidad y afinidad, por lo que son difícilmente reproducibles (Magadán & González-Fernández, 2004).

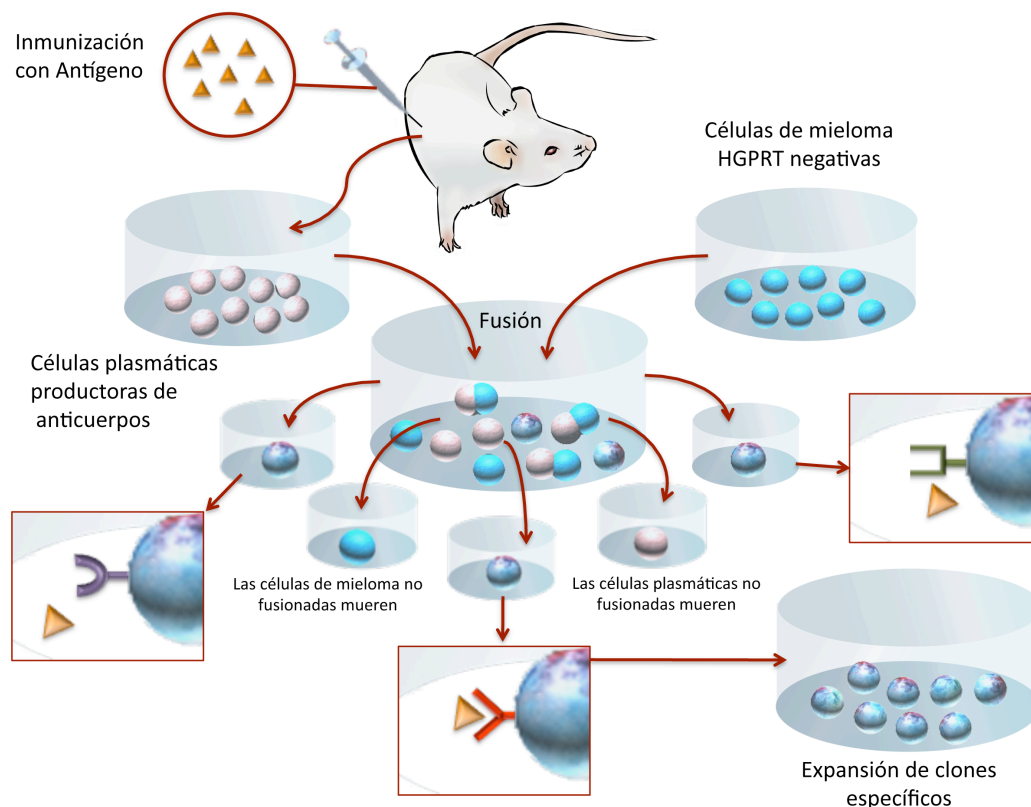


Figura 2: Esquema para la obtención de anticuerpos monoclonales por la tecnología del hibridoma.

El desarrollo de la tecnología del hibridoma para la producción de AcMos en el año 1975 por George Köhler y César Milstein (Köhler & Milstein, 1975) supuso una verdadera revolución en todos los campos de la biomedicina. El procedimiento clásico para la generación de AcMos (Figura 2) se inicia con la inmunización de un animal con el Ag o la mezcla antigénica de interés. Tras la inmunización se obtienen los linfocitos B activados, generalmente del bazo del animal, y se fusionan, mediante el uso de agentes como el polietilenglicol (PEG), con una célula de mieloma (que aporta al hibridoma la capacidad de dividirse indefinidamente) deficiente en alguna de las enzimas necesarias para la síntesis de nucleótidos por la vía de rescate, bien la timidín quinasa (TK) o bien la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT). Tras la selección de hibridomas con medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina), que permite únicamente la supervivencia de células híbridas, se realiza el análisis (*screening*) de los sobrenadantes de cultivo mediante ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA), citometría o transferencia *Western*, y se seleccionan aquel o aquellos hibridomas que expresan el AcMo deseado (Figura 2). La clonación de los hibridomas de interés (mediante dilución límite o en agar) permite individualizar una célula híbrida única que se expandirá y

conservará. De esta forma se pueden obtener Acs producidos por un clon celular (monoclonales) que derivan de un único linfocito B. Estos AcMos son por tanto homogéneos, específicos de epítomos individuales y se pueden producir en grandes cantidades. Sin embargo, su uso clínico presenta importantes limitaciones derivadas de su origen no humano: corta vida media sérica, ineficiente reclutamiento de funciones efectoras y problemas inmunológicos derivados de respuestas inmunes dirigidas frente a las IgGs murinas (HAMA, del inglés *Human Anti-mouse Antibodies*), provocando en unos casos la pérdida de eficacia, y en otros una reacción inmune generalizada potencialmente grave (Klee, 2000; Rojas *et al* 2004). Con el fin de salvar estos obstáculos y obtener AcMos humanos se han empleado diferentes estrategias. Una primera aproximación fue la utilización de linfocitos B humanos de sangre periférica para la obtención de hibridomas, pero la especificidad no se podía predefinir, ya que éticamente no es admisible el empleo de protocolos de inmunización en personas sanas (Rojas *et al* 2004). Además los híbridos entre células humanas y murinas son funcional y genéticamente inestables y tienen tendencia a perder selectivamente los cromosomas humanos cuando se mantienen en cultivo durante periodos prolongados (Rojas *et al* 2004).

La generación de líneas de ratones transgénicos con sistemas inmunes “humanizados”, representa un hito importante. Los transgenes que portan estos ratones presentan gran parte del repertorio de los genes V humanos en línea germinal, lo que permite el desarrollo de una población de linfocitos B y la formación de un amplio y diverso repertorio primario de Acs humanos. Estos ratones son capaces de generar Acs humanos de afinidad intermedia/alta, ya que pueden introducir mutaciones en los genes de las Ig humanas por el mecanismo de hipermutación somática en sus linfocitos B maduros. La introducción de *loci*, de las Igs humanas, para la generación de diversas cepas de ratones productores de Acs humanos, se ha llevado a cabo usando distintos vectores como los *miniloci*, los cromosomas artificiales de levaduras (YACs) y humanos (HACs) y los vectores P1 (Brüggemann & Neuberger, 1996). Estos ratones transgénicos se cruzan posteriormente con ratones a los que se les han eliminado genes de Igs endógenas para, finalmente, conseguir un ratón que sólo sea capaz de producir Igs humanas. Los animales son inmunizados y sus bazo se utilizan para la obtención de hibridomas mediante el protocolo convencional.

3. INGENIERÍA DE ANTICUERPOS: ANTICUERPOS MONOCLONALES DE SEGUNDA GENERACIÓN

El desarrollo de las técnicas de ingeniería genética, ha permitido generar una gran variedad de moléculas con nuevas propiedades estructurales y funcionales. Surgieron así los AcMos de segunda generación: anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos recombinantes, y fragmentos de anticuerpos.

3.1 ANTICUERPOS MONOCLONALES QUIMÉRICOS

Los Acs quiméricos (AcQ), desarrollados con la finalidad de disminuir la inmunogenicidad de los AcMos murinos, son moléculas artificiales compuestas por regiones variables provenientes de Igs murinas y regiones constantes de Igs humanas (Figura 3). Su construcción implica el aislamiento de los genes de las regiones V_H y V_L de un AcMo a partir del hibridoma de interés, y su clonaje en vectores de expresión que contienen la secuencia de los genes C_H o C_L humanos (Boulianne *et al*, 1984; Gorman & Clark, 1990; Hoogenboom *et al*, 1992; Morrison *et al*, 1984). Se han generado una gran variedad de AcQs, algunos de los cuales han sido aprobados para uso terapéutico (Alvarez-Vallina, L. 2004). El listado de todos los AcMos aprobados se puede consultar en organismos oficiales internacionales como la Agencia Europea del Medicamento (EMA, www.ema.europa.eu) o la FDA (*US Foods and Drugs Administration*, www.fda.gov). Sin embargo, Algunos AcQs son capaces de inducir respuestas inmunes (HACA, del inglés *Human Anti-Chimeric Antibodies*). Esta inmunogenicidad es debida al reconocimiento de epítomos situados en los dominios V murinos. Para reducir la inmunogenicidad de los AcMos terapéuticos, se desarrollaron las moléculas “humanizadas” o *human-like* (Güssow & Seemann, 1991; Jones *et al*, 1986; Riechmann *et al*, 1988).

3.2 ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANIZADOS

Para reducir la inmunogenicidad de los AcMos terapéuticos, se desarrollaron las moléculas “humanizadas” o *human-like* (Güssow & Seemann, 1991; Jones *et al*, 1986; Riechmann *et al*, 1988). Un AcMo humanizado (AcHz) es una molécula completamente humana a excepción de las CDRs, que son de origen murino (Figura 3). Para generar un AcHz, la secuencia codificante de las CDRs de un AcMo de interés se clonan entre las

FRs de un dominio V humano en un proceso denominado *CDR grafting*. La principal ventaja de los AcHzs es que los epítomos potencialmente inmunogénicos asociados a las regiones FRs murinas están ausentes (Kim *et al*, 2005). Las desventajas de este proceso son por un lado su complejidad y, por otro, que no siempre se elimina la inmunogenicidad del AcHz, pues se han observado casos de respuestas inmunes dirigidas frente a los AcHzs (HAHA, del inglés *Human Anti-Humanized Antibodies*) (Tan *et al*, 2002). Además, la manipulación e inserción de CDRs murinas en un contexto de FRs humanas condiciona una disminución de la afinidad de la interacción Ag-Ac (Winter & Harris, 1993). Para solventar estos problemas, se han desarrollado diversas estrategias destacando la sustitución selectiva de los dominios más expuestos de las CDRs murinas en lugar de la secuencia completa de las CDRs, la sustitución selectiva de determinados residuos de las CDRs murinas, y la superhumanización, que consiste en la búsqueda de genes V humanos con el mismo tipo de estructuras canónicas que las del AcMo murino de interés, utilizando aquellos que posean mayor homología de secuencia, a los que se les sustituye los residuos no homólogos de las CDRs.

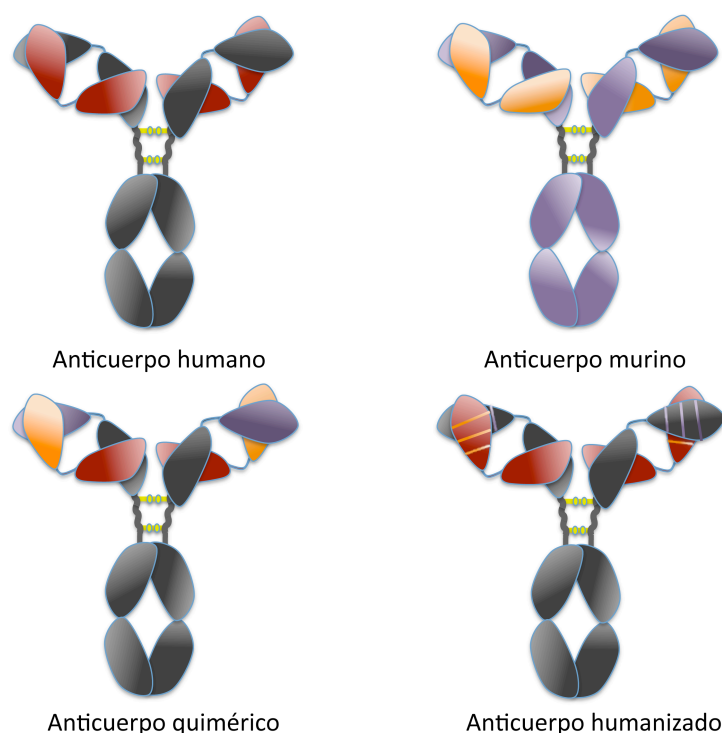


Figura 3:
Diagramas esquemáticos de diversos tipos de AcMos:
murinos, humanos, quiméricos y humanizados.

3.3. FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS

Antes del desarrollo de las técnicas de ingeniería genética la única posibilidad de obtener fragmentos de Ac (Figura 1) con capacidad de unión al Ag era mediante la acción

de enzimas proteolíticas que permitían generar los fragmentos Fab y F(ab')₂ (que incluye el fragmento Fab y la región bisagra) o el fragmento Fv, que por su pequeño tamaño (25 kD) es un vehículo ideal para numerosas aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Sin embargo, las interacciones débiles que unen las regiones V los hacen muy inestables a temperaturas fisiológicas. Para mejorar la estabilidad y preservar la conformación de este tipo de fragmentos recombinantes se han desarrollado diferentes estrategias entre las que destacan la introducción de puentes disulfuro adicionales y la adición de segmentos peptídicos flexibles que conectan los genes de las regiones V de la misma cadena o de cadenas distintas (Rojas *et al*, 2004). En la década de los 80 del pasado siglo se publicaron varios trabajos (Rojas *et al*, 2004) en los cuales se demostró la producción en *Escherichia coli* de una versión recombinante de un fragmento Fv, en la que los dominios V_H y V_L estaban unidos físicamente por un espaciador peptídico flexible (*linker*) de 15-20 aminoácidos. Este *linker* permitía el apareamiento intramolecular de ambos dominios para formar un sitio de unión al antígeno (Fv) funcional. Estas construcciones se denominaron fragmentos variables de cadena única o scFv (del inglés *single chain Fv*). Los scFv, además de ser expresados en bacterias, también han sido expresados en otros hospedadores como en la levadura *Pichia pastoris*, en células de insecto y en células de mamífero. El scFv es el formato preferido para producir fragmentos recombinantes de Ac, para generar proteínas de fusión y para la construcción de repertorios de Acs. Sin embargo, desde el descubrimiento de un tipo de Acs de camello, constituidos por dímeros de cadena H y desprovistos de cadena L, la utilización de Acs monodominio, compuestos únicamente por la región V_H, y que presentan diversas ventajas frente a los scFvs en determinados contextos, debido a su menor tamaño, ha experimentado un gran desarrollo.

Uno de los principales objetivos en el campo de la investigación con Acs recombinantes (AcRs), es la obtención de nuevos formatos con vida media más larga que los pequeños fragmentos de Acs, pero sin que su tamaño sea demasiado grande, para limitar su accesibilidad a los tejidos de interés. En la búsqueda de este “equilibrio entre accesibilidad y vida media”, se han generado numerosos formatos de Ac (Figura 4), que tiene un tamaño molecular por encima del límite de filtración glomerular (60 kDa), y una vida media lo suficientemente larga como para que lleven a cabo su acción. Para aumentar la vida media de los AcRs se han propuesto diferentes estrategias, siendo la más obvia la multimerización. Otra estrategia consiste en la producción de AcRs biespecíficos

que reconocen simultáneamente su Ag diana y las Igs séricas, con lo que no sólo recuperan las funciones efectoras ligadas a la región Fc, sino que también prolongan su vida media (Figura 4) (Müller *et al*, 2007).

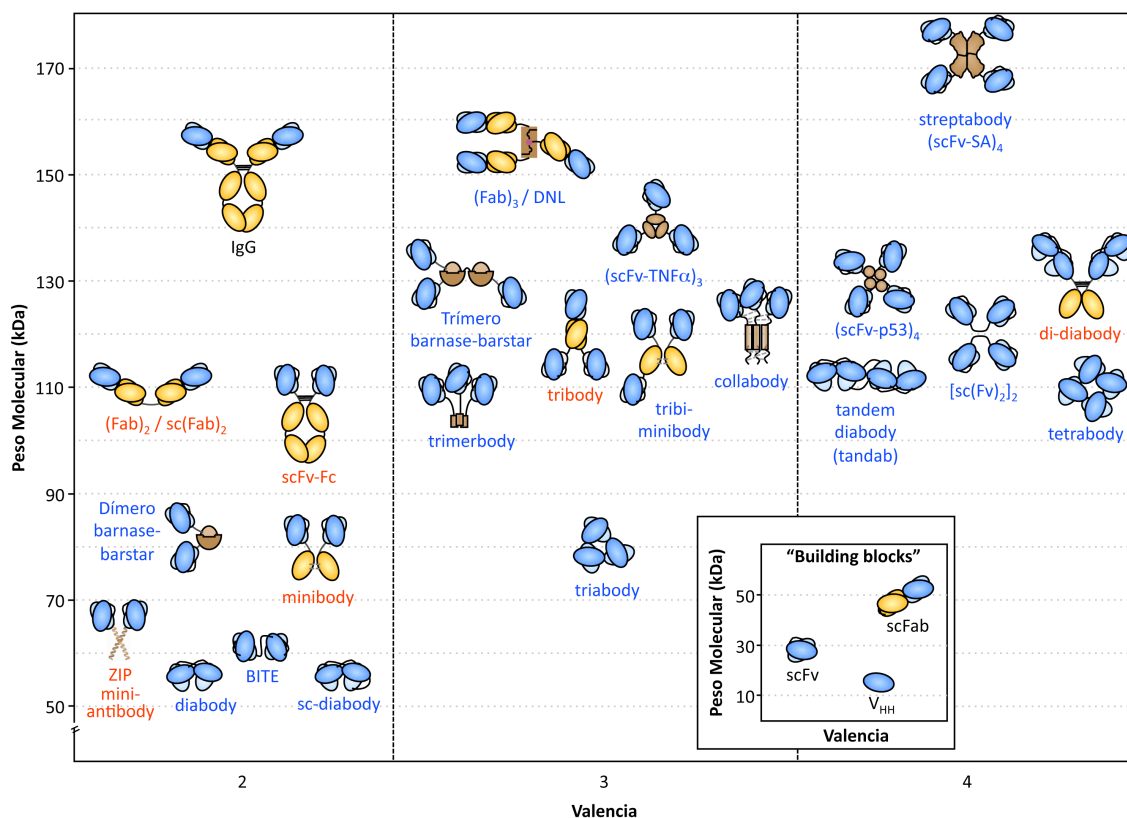


Figura 4: Clasificación, según peso molecular (kDa) y valencia, de los principales fragmentos recombinantes derivados de Acs. Aparecen únicamente aquellos Acs que han sido utilizados en ensayos de imagen molecular o de los que se han descrito características funcionales y/o estructurales que demuestran su multivalencia. Modificado de Cuesta *et al*, 2010.

4. TECNOLOGÍAS DE SELECCIÓN DE ANTICUERPOS A PARTIR DE REPERTORIOS O GENOTECAS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

4.1 PLATAFORMAS VIRALES

4.1.1. PLATAFORMAS BASADAS EN BACTERIÓFAGOS

Debido al enorme potencial de los Acs, durante las últimas décadas se ha intentado desarrollar nuevas estrategias alternativas para la construcción de moléculas con capacidad de unión al Ag similares a las Igs. Una de las primeras aproximaciones, desarrollada en 1989 consistió en el clonaje, a partir de linfocitos B de ratones

inmunizados con un Ag, de los genes de los Acs en un vector de expresión procariota, para la expresión en bacterias de cadenas V_H, cadenas V_L o fragmentos Fab (Orlandi *et al*, 1989; Ward *et al*, 1989; Huse *et al*, 1989). Así se conseguía la obtención de repertorios o genotecas de Acs para la selección de clones de interés. La primera plataforma para la exposición de repertorios genéticos que se desarrolló y que aún hoy sigue siendo la metodología predominante por su simplicidad y versatilidad, es la tecnología de presentación (TP) de péptidos y proteínas en la superficie de fagos (bacteriófagos) filamentosos (TPPF; en inglés *Phage Display Technology*) (Hoogenboom, 2005). Los fagos filamentosos son bacteriófagos atemperados del género *Inovirus*, que tienen como características principales las de presentar un ADN monocadena e infectar bacterias Gram-negativas de forma lisogénica, lo que permite la generación de múltiples copias de partículas víricas sin que esto suponga la lisis de la bacteria infectada (Winter *et al*, 1994). Los fagos tienen una morfología cilíndrica de 900 nm de largo por 6 nm de diámetro y están constituidos por una envoltura proteica en cuyo interior se encuentra una molécula de ADN circular de cadena única de 6,4 kilobases. La cápside está constituida, mayoritariamente, por la proteína VIII (2.700 copias/fago) y por las proteínas III, VI, VII y IX como proteínas minoritarias (Figura 5A) (Specthrie *et al*, 1992). En la década de los ochenta del pasado siglo, George Smith (Smith, 1985) demostró que el genoma del bacteriófago podía ser manipulado con facilidad para obtener partículas virales con péptidos fusionados a las proteínas de la envoltura y que estos péptidos podían ser reconocidos mediante Acs específicos. Esta observación es el origen de la TPPF, que se basa en la fusión de colecciones de genes a aquellos genes que codifican alguna de las proteínas de la envoltura del fago. Como resultado se producen bacteriófagos, cada uno de los cuales presenta (expone) un único tipo de proteína en su superficie. Esta asociación física entre fenotipo y genotipo es la característica fundamental de la TPPF (Rojas *et al* 2004). En la tecnología TPPF los fragmentos de Ac se expresan en la superficie del fago filamentosos gracias a la fusión de la secuencia codificante de los mismos con la de una de las proteínas de la superficie del fago, la proteína pIII o la proteína VIII (Hoogenboom, 2005). En ambos casos, la inserción de la secuencia se realiza en el extremo aminoterminal. La presentación en el contexto de la proteína VIII es multivalente, explota el fenómeno de la avidéz y permite “capturar” aquellos fagos que forman uniones débiles con el ligando. Por el contrario, las bibliotecas de presentación monovalentes emplean la proteína III (3-5 copias/bacteriófago) y se usan en situaciones donde se precisan interacciones de mayor afinidad. Para la construcción de genotecas se

los fagos resultantes es mixta, pues combinan las proteínas naturales provenientes del fago *helper* con las proteínas de fusión codificadas en el fagómido (Rojas *et al* 2004).

La generación del repertorio que exponen los fagos se ha basado en dos estrategias: a) la amplificación de repertorios endógenos/naturales de regiones V mediante PCR, en un principio de origen murino y más tarde de origen humano (Griffiths *et al*, 1994; DeHaard *et al*, 1999; Reiche *et al*, 2002; Smith *et al*, 2004); y b) el diseño y construcción de repertorios totalmente sintéticos sobre la base del conocimiento de la estructura y la diversidad de las Igs (Knappik *et al*, 2000; Pini *et al*, 1998; Söderlind *et al*, 2000). La probabilidad de encontrar Acs con capacidad de unión a dianas diferentes depende, en gran medida, del tamaño de la genoteca. Los genes de las regiones V obtenidas se clonan en vectores fagómidos y se emplean para transformar bacterias. El número de bacterias transformadas representa el tamaño de la genoteca y la diversidad. La selección de los bacteriófagos se puede realizar empleando Acs purificados (proteínas, hidratos de carbono o lípidos), mezclas antigénicas o incluso células, mediante un procedimiento denominado *biopanning* (Figura 5C) que se basa en la afinidad entre las moléculas expuestas en la superficie del bacteriófago y el ligando deseado, generalmente unido a una fase sólida. A continuación, se realiza un proceso de lavado para eliminar los fagos no específicos y una elución de los fagos específicos unidos al ligando. Con los fagos eluidos se procede a la infección de bacterias para la obtención y expansión de colonias bacterianas, cada una de las cuales poseerá el genoma de un clon de Ac distinto, ya que la secuencia que codifica el péptido o Ac se encuentra en el genoma del bacteriófago y por tanto en la bacteria infectada (Rojas *et al* 2004).

La caracterización de los clones seleccionados se realiza mediante ensayos de unión (ELISA, citometría, etc.), tanto en el “contexto” del fago, con el AcR expresado como proteína de fusión en su superficie, como AcR soluble. Posteriormente, se realiza la caracterización molecular de los clones seleccionados. Se amplifica mediante PCR la región de ADN correspondiente al AcR y se digiere con una enzima de restricción de corte frecuente, produciendo un patrón típico de digestión que se asemeja a la “huella dactilar” de cada AcR (*fingerprinting*). La caracterización molecular se completa mediante la secuenciación de las regiones V (Rojas *et al* 2004).

4.1.2. PLATAFORMAS BASADAS EN VIRUS DE CÉLULAS EUCARIOTAS

A pesar de que el uso de bacteriófagos para la exposición y selección de Acs ha sido y sigue siendo utilizado en infinidad de contextos con gran éxito, presenta limitaciones importantes: muchos Acs dejan de ser funcionales cuando se expresan en células eucariotas, debido a las diferencias en las modificaciones y plegamiento de las proteínas en ambos sistemas. Por ello, se desarrollaron tecnologías basadas en ambientes eucariotas. Una de ellas es la tecnología de presentación de Acs en la superficie de oncorretrovirus (TPPR; en inglés *Retrovirus Display Technology*) (Sanz *et al*, 2002; Urban *et al*, 2005; Buchholz *et al*, 1998; Khare *et al*, 2003; Russell *et al*, 1993) o adenovirus (Wu *et al*, 2010). El empleo de estos virus presenta ventajas para la selección de Acs debido a que no es necesario eluir las partículas virales unidas al Ag de interés, ya que es posible añadir células susceptibles a la infección, para el rescate y amplificación de la partícula viral portadora del Ac de interés.

4.2. PLATAFORMAS BASADAS EN CÉLULAS MICROBIANAS

Se han utilizado bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Zymomonas mobilis* para la exposición de Acs en la pared celular. Sin embargo, los dificultades derivadas de la producción de los Acs en sistemas heterólogos y problemas asociados a la accesibilidad del Ac al Ag en este sistema hacen que estas plataformas de presentación sean poco operativas para la selección de Acs. Por este motivo, esta tecnología se ha utilizado mayormente para la presentación de péptidos o enzimas. La presentación de Acs en la superficie de células eucariotas como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ha permitido seleccionar Acs a partir de repertorios mediante citometría de flujo (CF) (Boder & Wittrup, 1997). Los Acs se fusionan al receptor de adhesión α -glutinina, localizado en la pared celular. El repertorio se expone al Ag, marcado con un fluorocromo, de forma que se pueden seleccionar las células con Acs específicos, mediante CF separadora (Hoogenboom *et al*, 1991).

4.3. PLATAFORMAS BASADAS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

Ante la necesidad de desarrollar TP de repertorios en contextos eucariotas, a través de las cuales la producción y procesamiento de los Acs ocurra en un ambiente más “fisiológico”, se han desarrollado diversas aproximaciones basadas en la exposición de Acs en la superficie de células de mamífero (Wolkowicz *et al*, 2005; Ho *et al*, 2006;

Beerli *et al*, 2008; Taube *et al*, 2008), de forma que las células que expresan un Ac capaz de unirse a un Ag de interés, normalmente añadido en forma soluble y marcado con fluorocromos, son seleccionadas mediante CF. Sin embargo, estos métodos, al igual que la TPPF, son tecnologías de selección basadas únicamente en interacciones físicas, que requieren reiterar el proceso múltiples veces.

4.4. OTRAS PLATAFORMAS DE SELECCIÓN

Aparte de las tecnologías mencionadas, que requieren el uso de un “soporte celular”, ya sea procariótico o eucariótico, para la exposición de Acs, existen otras plataformas en las que la transcripción, traducción y selección se realiza *in vitro* en sistemas “libres de células”. Un ejemplo es el *ribosome display* (Hanes & Plückthun, 1997; Mattheakis *et al*, 1994; Schaffitzel *et al*, 1999). En este sistema, un repertorio de Acs es transcrito y traducido *in vitro*. El ARNm carece de codón stop, produciéndose complejos ARNm-ribosoma-Ac. Estos complejos, son utilizados para una selección *in vitro*, usualmente frente a un Ag inmovilizado. El ARN de los complejos unidos a la diana se eluyen y purifican, para proceder a una retrotranscripción. El ADN obtenido puede ser utilizado para sucesivas rondas de selección. Se han desarrollado variantes de esta tecnología, en las que el ribosoma es eliminado durante selección, y el ARNm y la proteína traducida se mantienen unidas mediante un *linker* (Roberts & Szostak, 1997; Nemoto *et al*, 1997) . También se han desarrollado mecanismos de selección basados en complejos ADN-anticuerpo (Odegrip *et al*, 2004; Reiersen *et al*, 2005).

4.5. SELECCIÓN *IN VIVO* DE ANTICUERPOS

La mayor parte de las plataformas descritas anteriormente se han utilizado para la selección *in vitro* de Acs, fundamentalmente frente a proteínas o péptidos purificados, ya sean inmovilizados en placa o en solución. Las plataformas basadas en virus en cambio, se han utilizado también para la selección de Acs frente a células y tejidos *in vitro*. Sin embargo, los virus administrados de forma sistémica tienen que sobrevivir a los mecanismos efectores del sistema inmune (Paillard, 1998), que originan la pérdida de gran parte del repertorio tras la administración por vía intravenosa. Además tienen que evitar la adhesión no específica a las paredes vasculares (Pizzato *et al*, 1999) y extravasar a los tejidos de interés, lo cual es un proceso bastante ineficiente para una partícula inerte como un virus (Zhang *et al*, 2006). En numerosas ocasiones, sobre todo en el caso de las

proteínas de la superficie celular, los Ags no presentan la misma conformación en forma soluble o adheridos a placa que cuando son expresadas en su contexto celular. Además en un contexto tumoral, donde las células están expuestas a múltiples influencias del microambiente, el perfil de expresión antigénico puede ser distinto al que presentaría la misma población *in vitro*. Esto explica que muchos Acs que han sido seleccionados *in vitro* podrían no ser eficaces *in vivo*. Por este motivo, es necesario diseñar nuevas plataformas de selección para la generación *in vivo* de Acs. Este es uno de los objetivos más difíciles en el campo de la selección de Acs con finalidad diagnóstica y terapéutica.

5. INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL DE BASE CELULAR

5.1 RECONOCIMIENTO Y ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T POR EL ANTÍGENO

El reconocimiento del Ag por parte de las células T es el estímulo para el inicio de su activación y de varias respuestas funcionales, incluyendo la secreción de citoquinas, la proliferación y la puesta en marcha de funciones reguladoras y efectoras citolíticas (Altman *et al*, 1990). Las células T no son capaces de reconocer el Ag en su forma nativa, sino que reconocen un complejo bimolecular formado por fragmentos peptídicos asociados al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) expresado en la superficie de otras células, denominadas en este contexto células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *Antigen presentation cells*) (Schwartz, 1985; Brown *et al*, 1988). Las moléculas del MHC son glicoproteínas integrales de membrana, altamente polimórficas constituidas por la asociación no covalente de dos cadenas polipeptídicas y están involucradas en el tráfico intracelular y transporte hacia la superficie celular de péptidos derivados del catabolismo proteico (Braciale *et al*, 1987; Burgdorf & Kurts, 2008). La región MHC está dividida en 3 subgrupos de genes: MHC de clase I, MHC de clase II y MHC de clase III. Los péptidos derivados de proteínas endógenas (ya sean propias o proteínas virales de células infectadas se asocian con moléculas de clase I, mientras que los péptidos derivados de proteínas exógenas que han sido endocitadas y degradadas en el compartimento lisosomal, se asocian a MHC-II (Monaco, 1992; Neeffes & Ploegh, 1992; Burgdorf & Kurts, 2008). Por tanto, el origen del Ag y la vía de contacto con el, evolutivamente ha derivado en una localización diferenciada de las moléculas de MHC: Mientras que las moléculas de MHC-I se expresan en prácticamente todas las células nucleadas del organismo, a excepción del endotelio, trofoblasto y neuronas del sistema

nervioso central, las de MHC-II se expresan únicamente en macrófagos, células dendríticas y linfocitos B (Neefjes & Ploegh, 1992; Yewdell & Bennink, 1992; Burgdorf & Kurts, 2008). A su vez, las vías de respuesta del sistema inmune que se van a poner en marcha van a ser distintas en función del origen del Ag, ya que el MHC-I es reconocido únicamente por el TCR de las células T citotóxicas o T CD8⁺ (Norment *et al*, 1988), que median la lisis de células que exponen antígenos extraños en su MHC-I, mientras que el MHC-II es reconocido por el TCR de las células T colaboradoras o T CD4⁺ (Doyle & Strominger, 1987), que estimulan la producción de Acs por parte de las células B y la acción microbicida de los macrófagos.

El TCR por su parte es un heterodímero en el que las dos cadenas polipeptídicas, unidas por puentes disulfuro, son clonalmente variables (tienen regiones hipervariables generadas por procesos similares a los que se dan en la generación de la diversidad de los Acs) y están relacionadas con las cadenas polipeptídicas de las Igs (van der Merwe & Dushek, 2011). Existen cuatro familias de genes que codifican estas cadenas: α , β , γ y δ , pero cada linfocito T utiliza solamente uno de los dos heterodímeros posibles, que son α/β , ó γ/δ . El primero está presente en la mayor parte de las células T de sangre periférica (Fathman & Frelinger, 1983), mientras que el segundo se expresa únicamente en un 2-5% de las células T de sangre periférica, si bien es el TCR predominante de las células T de otras localizaciones, como son el intestino y la piel (Brenner *et al*, 1986; Bank *et al*, 1986; Kabelitz *et al*, 2007). Ambos tipos de receptores, TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$ se asocian de manera no covalente en la superficie celular con un grupo de proteínas clonalmente invariables denominado colectivamente TCR/CD3. Este complejo está constituido por cuatro cadenas polipeptídicas, γ , δ , ϵ , y ζ , involucradas en la inserción en la membrana del TCR y en la transmisión de la señal al interior celular tras el contacto del TCR con el complejo péptido antigénico-MHC. Todas las subunidades del complejo contienen motivos de inmunoreceptor basados en tirosina (ITAM, del inglés *Immunoreceptor tyrosin-based activation motifs*) en sus dominios citoplasmáticos. La unión del TCR al ligando origina cambios bioquímicos en las porciones citoplasmáticas de los componentes del complejo TCR/CD3, que incluyen la fosforilación de los ITAMs, y cambios conformacionales. Todos estos cambios en su conjunto son denominados *TCR triggering* e incluyen una gran variedad de procesos que acaban por dar lugar a diversas respuestas funcionales de la célula T (van der Merwe & Dushek, 2011). El resultado es la expansión clonal, que genera la suficiente cantidad de células T específicas

para hacer frente al Ag extraño; y la diferenciación celular, que transforma a las células T en células efectoras activadas, proceso que conlleva cambios en el control transcripcional de los genes que codifican moléculas efectoras liberadas por la célula T, así como el control de la expresión de moléculas de superficie de la célula T que participarán a diversos niveles en la respuesta efectora. Entre estas se encuentran las moléculas de respuesta temprana, como el CD69 (Sancho *et al*, 2005) y las moléculas de respuesta tardía, como el CD25 o el CD134 (OX40). Tras la fase de diferenciación celular o activación llega la fase efectora, en la cual se iniciarán procesos como la estimulación de la célula B, activación de macrófagos, estimulación de la inflamación y colaboración para la diferenciación de los linfocitos T citolíticos.

Además del complejo TCR/CD3, las células T expresan otras proteínas integrales de membrana que desempeñan papeles importantes en el reconocimiento del Ag. A este conjunto de moléculas se las denomina proteínas accesorias y se unen a otras moléculas (ligandos) presentes en la superficie de las APC, células diana o endotelio vascular, o a moléculas de la matriz extracelular. La unión de estas moléculas a sus ligandos produce un aumento en la adhesión de la célula T a la APC o a la célula diana, así como la activación de señales bioquímicas necesarias para la regulación de las respuestas funcionales, proliferación y supervivencia celular. Algunos ejemplos de estas moléculas son CD28, CD152 (CTLA-4), CD137, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) CD4, CD8, CD45R, ligando de CD40 (CD154), ligando de Fas (CD95L) y muchas otras (Greenfield *et al*, 1998).

Una de las propiedades fundamentales del sistema inmune es la capacidad para reconocer y responder frente a Ags extraños, pero no frente a Ags propios. Esto se consigue mediante los procesos de tolerancia central (desarrollados en los órganos linfoides generadores) y de tolerancia periférica (en otros tejidos del organismo). Mediante estos procesos, los clones que reconocen Ags propios, llamados autorreactivos, son eliminados mediante procesos de anergia clonal o selección negativa, fenómenos de supresión mediante células T reguladoras y muerte celular inducida por activación (AICD, del inglés *activation-induced cell death*), proceso por el que las células T estimuladas repetidamente entran en apoptosis. Con dichos procesos, el sistema inmune elimina los clones autorreactivos, evitando respuestas inmunes frente a Ags propios (autoinmunidad) (Greenfield *et al*, 1998; Brenner D *et al*, 2008; Krammer *et al*, 2007).

5.2 ESTRATEGIAS BASADAS EN RECEPTORES TCR $\alpha\beta$ Y TCR $\gamma\delta$: TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE LINFOCITOS INFILTRANTES DEL TUMOR.

Durante las últimas décadas la inmunoterapia antitumoral, que incluye aproximaciones activas y pasivas tales como la vacunación con Ags tumorales, el tratamiento con AcMos que reconocen Ags asociados a tumor (TAA, del inglés *tumor-associated antigens*), y la transferencia adoptiva de linfocitos T infiltrantes del tumor (TIL, del inglés *tumor-infiltrating lymphocytes*), han experimentado un gran desarrollo. Sin embargo, el impacto clínico de estas aproximaciones ha sido muy reducido, lo cual se ha relacionado con la ausencia de células T con especificidad antitumoral (Rosenberg, 2004). Además, los mecanismos reguladores del huésped y los mecanismos para la homeostasis inmune, limitan la eficacia clínica de las células T antitumorales administradas (Cartellieri *et al*, 2010). Debido a las enormes dificultades para generar cantidades suficientes de células T con especificidad antitumoral, se han desarrollado protocolos de modificación genética de células T con cadenas TCR $\alpha\beta$, y más recientemente un TCR $\gamma\delta$ (Kabelitz *et al*, 2007); que reconocen un TAA o un Ag específico de tumor (TSA, del inglés *tumor-specific antigens*).. Este tipo de terapias, ha demostrado su utilidad en diversos ensayos clínicos, principalmente en pacientes con melanoma (Morgan *et al*, 2006). Sin embargo, el uso de TCRs específicos presenta limitaciones importantes, debido principalmente al reducido número de Ags tumorales conocidos y a la dificultad para obtener células T que expresan TCRs con afinidad intermedio/alta. Como aproximación para resolver este problema, se han desarrollado estrategias de ingeniería genética que permiten la obtención de hibridomas T TCR-negativos, que expresan cadenas TCR α y β exógenas reordenadas al azar, permitiendo la formación de novo de TCRs capaces de reconocer cualquier Ag humano (Kessels *et al*, 2000; Chervin *et al*, 2008). Sin embargo, el uso de TCRs Ag específicos presenta inconvenientes importantes, debido a que la activación de la célula T implica que un fragmento peptídico derivado del Ag, sean presentado en el contexto de un molécula MHC específica. La reducción o pérdida de expresión de moléculas MHC, frecuentemente observada en muchos tipos tumorales (Reiniš M, 2010), así como la diversidad alélica poblacional, complican la aplicación y universalización de este tipo de terapias.

5.3 ESTRATEGIAS BASADAS EN RECEPTORES QUIMÉRICOS

Para intentar solventar algunas de las desventajas de los sistemas convencionales de terapia adoptiva con células T, se desarrollaron los receptores de Ag quiméricos (CAR, del inglés *Chimeric Antigen Receptors*) (Gross *et al*, 1989; Sadelain *et al*, 2003). La “tecnología CAR” fue descrita por primera vez en 1989 (Gross *et al*, 1989) y desde entonces se han realizado muchos esfuerzos para mejorar “sus prestaciones”. Los CARs, también denominados *T-bodies*, son proteínas de fusión formadas por un segmento de reconocimiento del Ag unido a las porciones transmembrana e intracelular de proteínas con capacidad de transducir la señal y activar a la célula T (Figura 6).

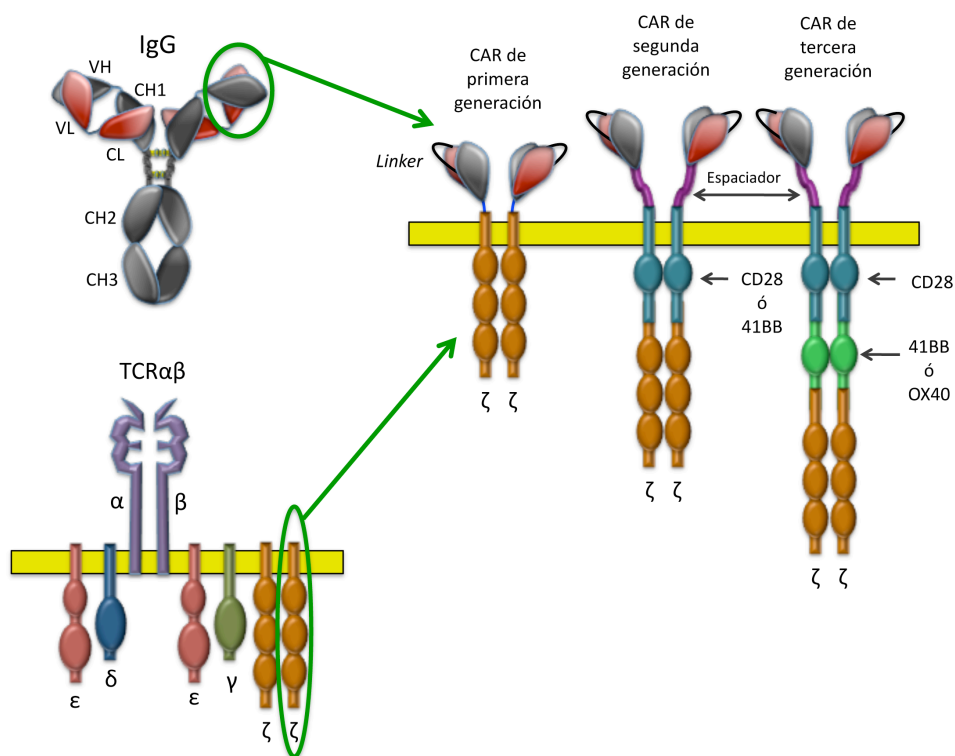


Figura 6: Esquema de la estructura un receptor de Ag quimérico (CAR). Un CAR esta formado por un segmento de unión, normalmente un scFv, un segmento transmembrana y un segmento de señalización (p.ej. cadena ζ del complejo TCR/CD3). Los CARs de segunda generación incorporan en serie una moléculas co-estimuladoras como el CD28 o el CD137, mientras que los CARs de tercera generación incorporan al menos dos moléculas co-estimuladoras.

La porción extracelular del CAR, que redirige a la célula efectora hacia el tumor, es normalmente un fragmento scFv. La capacidad de señalización intracelular la aporta, por lo general, la porción citoplasmática de una cadena del complejo TCR/CD3 del linfocito

T (ϵ , γ o ζ), aunque también se han empleado receptores FcR como dominio de transmisión de señales.

Los CARs se expresan como receptores funcionales en la membrana de la célula T (*T-bodies*) y, tras su interacción con el antígeno, transducen señales de activación similares a las observadas tras la interacción fisiológica mediada por el complejo TCR-CD3 (Alvarez-Vallina, 2001). Esta interacción Ag específica, independiente del MHC, dispara la secreción de citoquinas y puede mediar la citólisis de las células diana que expresan el antígeno reconocido por el CAR (Sanz *et al*, 2004). El hecho de que la activación sea independiente del MHC aporta una ventaja fundamental frente al uso de TCRs, ya que las células T son eficaces incluso en ausencia de expresión de MHC-I por parte de la célula tumoral. Otra ventaja relacionada con este aspecto, es que la activación mediada por el TCR $\alpha\beta$, al depender del MHC, excluye el diseño de un receptor “universal” para el tratamiento de pacientes con distintos haplotipos de MHC. Los CARs sin embargo, al igual que los AcMos, “universales” por definición.

Las primeros ensayos clínicos con CARs de primera generación mostraron una limitada supervivencia de las células T CAR⁺ transferidas, y un escaso efecto terapéutico (Mitsuyasu *et al*, 2000; Walker *et al*, 2000; Kershaw *et al*, 2006; Park *et al*, 2007; Till *et al*, 2008). Este efecto limitado se ha relacionado con la ausencia de señales co-estimuladoras, y la inducción de fenómenos de AICD por-activación (Alvarez-Vallina *et al*, 2000). Con el objetivo de mejorar la supervivencia y/o proliferación de las células T portadoras de un CAR tumor-específico e incrementar su eficacia, se empezaron a utilizar moléculas co-estimuladoras incluyendo el CD28 (B7-1), CD134 (OX40) y CD137 (4-1BB). Inicialmente los segmentos derivados de moléculas coestimuladoras se emplearon en *trans*, mediante la cotransfección celular con dos CAR, uno basado en la cadena ζ y otro en CD28 (Alvarez-Vallina & Hawkins, 1996; Blanco *et al*, 2002), pero pronto surgieron los llamados CAR de segunda generación (Figura 6), en los que los segmentos derivados de moléculas co-estimuladoras CD28 (Finney *et al*, 1998; Maher *et al*, 2002; Kowolik *et al*, 2006; Vera *et al*, 2006), 4-1BB (Imai *et al*, 2004), o OX40 (Pulè *et al*, 2005) se insertan en serie con la cadena ζ , y los CAR de tercera generación, con más de un segmento derivado de moléculas co-estimuladoras en serie con la cadena ζ (Pulè *et al*, 2005; Milone *et al*, 2009; Finney *et al*, 2004) (Figura 6). Las señales co-estimuladoras, favorecen la supervivencia y proliferación de las células T activadas a través del CAR, tanto *in vivo* como *in vitro*. Hasta la fecha se han utilizado múltiples formatos de CAR

(Sadelain *et al*, 2009; Jena *et al*, 2010; Berry *et al*, 2009; Ertl *et al*, 2011) en procesos malignos hematológicos (Hombach *et al*, 1999; Cooper *et al*, 2003; Jensen *et al*, 2003; Vera *et al*, 2006), en tumores sólidos (Kershaw *et al* 2006; Lamers *et al*, 2006; Ahmed *et al*, 2007), e incluso en terapias antiangiogénicas (Chinnasamy *et al*, 2010). En total han sido registrados por la Oficina de actividades Biotecnológicas del NIH (*OBA, NIH Office of Biotechnology Activities*), al menos 40 ensayos clínicos con “tecnología CAR”, y otros tantos están bajo revisión del comité asesor de ADN recombinante del NIH (*RAC, NIH Recombinant DNA Advisory Committee*) y al menos 120 pacientes han participado en estos ensayos (Ertl *et al*, 2011). Sin embargo, recientemente se ha documentado el fallecimiento de dos pacientes tratados con células T que expresaban CARs de tercera generación (Brentjens *et al*, 2010; Morgan *et al*, 2010). Estos fallecimientos se han relacionado con el gran potencial de activación de los CAR de tercer generación, capaces de producir respuestas muy intensas en presencia de pequeñas cantidades de Ag. Esto implica la necesidad de realizar estudios muy precisos sobre el Ag diana, así como del formato de CAR, antes de iniciar un ensayo clínico (Ertl *et al*, 2011).

OBJETIVOS

En este trabajo, se propone el desarrollo de una plataforma para la presentación y Selección de Acs, basada en la Activación de Linfocitos T humanos (plataforma **SALT**). Con esta finalidad se plantearon los siguientes objetivos:

- I. Generar y validar una plataforma de presentación y selección de Acs humanos basada en células T mediante la expresión de un Ac recombinante, en formato scFv en el contexto de un CAR.
- II. Realizar procesos de selección *in vitro* de Acs humanos empleando la plataforma generada, a partir de células T que expresan un repertorio de scFvs en el contexto de un CAR.
- III. Realizar procesos de selección *in vitro* de Acs humanos empleando la plataforma generada, a partir de células T que expresan un repertorio de Acs monodominio (V_H), en el contexto de un CAR.
- IV. Generar y caracterizar un modelo animal de vasculatura tumoral humana que permita el estudio del proceso angiogénico tumoral y la selección *in vivo* Acs humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES

En la Tabla I se indican las líneas celulares utilizadas en este trabajo y las condiciones de cultivo.

Tabla I					
Líneas celulares					
Línea celular	Proveedor-Referencia	Tipo celular	Especie	Medio de cultivo	Suplementos
293T	ATCC ¹ CRL-11268	Fibroblasto de riñón embrionario	Humano	DMEM-C ²	-
HeLa	ATCC CCL-2	Carcinoma de cérvix	Humano	DMEM-C	-
HeLa ^{CEA}	P. Holliger ³ (Hefta <i>et al</i> , 1992)	Carcinoma de cérvix	Humano	RPMI-C ⁴	G418 ⁵ (750 µg/mL)
Jurkat (E6.1)	ATCC TIB-152	Leucemia T	Humano	RPMI-C	-
HT-1080	ATCC CCL-121	Fibrosarcoma	Humano	DMEM-C	-
MKN45	JCRB-0254 ⁶	Carcinoma gástrico	Humano	RPMI-C	-
MDA-MB231	ATCC HTB-26	Adenocarcinoma mamario	Humano	DMEM-C	-
K562	ATCC CCL-243	Linfoblasto	Humano	RPMI-C	-

1. ATCC: *American Type Culture Collection* (EE.UU.).

2. DMEM-C (DMEM Completo): Medio DMEM suplementado con un 10% (vol/vol) de suero bovino fetal (FCS), y con una mezcla de 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina.

3. Dr. Philip Holliger, *Medical Research Council* (MRC), Cambridge, Reino Unido.

4. RPMI-C (RPMI Completo): Medio RPMI suplementado con un 10% (vol/vol) de FCS, y con una mezcla de 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina.

5. G418: Neomicina.

6. JCRB: *Japanese Collection of Research Bioresources* (Japón).

Todos los medios de crecimiento y suplementos se obtuvieron de LONZA. Las células se cultivaron a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂, y se analizaron por PCR de forma rutinaria para descartar la contaminación por micoplasmas utilizando el *kit* “*Mycoplasma Plus TM Primer Set*” (Stratagen).

2. CÉLULAS PRIMARIAS

Las células endoteliales primarias aisladas de vena de cordón umbilical humano (HUVEC; del inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) fueron proporcionadas por la Dra. Mónica Feijóo (Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, España) y se cultivaron en medio EGM-2, suplementado con un 2% (vol/vol) de FCS, y un cóctel de factores de crecimiento (LONZA). Las células madre mesenquimales (MSC; del inglés *Mesenchymal Stem Cells*) procedentes de médula ósea fueron proporcionadas por el Dr. José Luis Vicario, (Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid, Madrid, España) y se cultivaron en medio MEM alfa suplementado con 2 mM glutamax (Life Technologies) y con un 10% (vol/vol) de FCS.

3. MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE CELULAR CON EL HAPTENO NIP.

Las células HeLa se lavaron dos veces (229 g, 5 minutos a 4 °C) con tampón fosfato salino (PBS) (pH 7,4), y se ajustaron a una concentración de 1×10^7 /mL. Se añadió a la suspensión celular el volumen necesario de una solución (50 mg/mL) de NIP-CAP-Osu (éster succinimida de 4-hidroxi, 3-nitro, 5-iodofenilacetil espaciado con ácido caproico) (Sigma-Aldrich) diluido en dimetilformamida seca, para obtener una concentración final de 2,5 µg/mL. Las células se incubaron durante una hora a 37 °C y se lavaron tres veces con 15 mL de PBS frío suplementado con un 10% (vol/vol) de FCS.

4. CONSTRUCCIONES GÉNICAS:

Para propagar y clonar los vectores se utilizaron en función del tipo de plásmido bacterias *E. coli* TOP-10 o *E. coli* Stbl3 (Life Technologies). Las bacterias transformadas con los distintos plásmidos se cultivaron a 37 °C en medio sólido TYE o en medio líquido 2xYT (ambos de Life Technologies), suplementados con 50 µg/mL de ampicilina (Life Technologies). Todas las técnicas generales de ADN recombinante se llevaron a cabo según métodos estándar (Sambrook, J. & Russell, D. W., 2006). Las enzimas fueron de New England Biolabs. El ADN plasmídico se purificó empleando los *kits* de aislamiento “*PureYield™ Plasmid Miniprep System*” (Promega) y “*Qiagen Midi-Prep kit*” (Qiagen). Los oligonucleótidos sintéticos se obtuvieron de Roche. Las construcciones

se revisaron por secuenciación usando el método de los dideoxinucleótidos y un secuenciador de ADN automático ABI-PRISM (Perkin Elmer).

Los vectores empleados y los vectores generados en este trabajo aparecen detallados en la Tabla II. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla III.

Tabla II (a)	Vectores			
Vector	Vector de origen	Inserto	Características	Proveedor-Referencias
pAB1	-	-		MRC ¹
pAB2	pAB1	-		Promotor lac Péptido señal PelB Amp ^R Etiqueta myc-6His
pAB2- S1.107	pAB2	scFv		
pAB2- S1.111				
pAB2- S1.132				
pAB2- S1.58				
pAB2- S1.64				
pAB2- S1.66				
pAB2- S1.86				
pAB2- S1.90				
pAB2- S1.99				
pAB2- S2.10				
pAB2- S2.128				
pAB2- S2.2				
pAB2- S2.25				
pAB2- S2.30				
pAB2- S2.35				
pAB2- S2.36				
pAB2- S2.76				
pAB2- S2.77				
pAB2- S3.102				
pAB2- S3.109				
pAB2- S3.16				
pAB2- S3.160				
pAB2- S3.169				
pAB2- S3.193				
pAB2- S3.26				
pAB2- S3.38				
pAB2- S3.45				
pAB2- S3.90				
pAB2- S3.97				
pAB1-B1.8	pAB1			LAV ²
pAB1-MFE23				LAV
pCEP4/ α NIP.TCR ζ	pCEP4		Promotor CMV Amp ^R Hygro ^R	LAV (Álvarez-Vallina <i>et al</i> , 1996)

Tabla II (b)	Vectores			
Vector	Vector de origen	Inserto	Características	Proveedor-Referencias
PGL3-Basic Vector		Luciferasa de <i>Photynus piralis</i>	Amp ^R	Promega
pHEN-2 L36			Promotor lac Región líder pelB Amp ^R	ACME
pHEN-2 MFE23	pHEN-2 L36	scFv MFE23	Etiqueta 6His- myc	Este trabajo
pMA- CD8α-CD28- TCRζ	pMA	CD8α-CD28- TCRζ	Amp ^R	Geneart
pMA-CD8α-CD28- CD137-TCRζ	pMA	CD8α-CD28- CD137-TCRζ		
pMD.G	-	proteína G de la envuelta del VSV-G ³	Promotor CMV	Dr. Trono ³ (Naldini <i>et al</i> , 1996)
pMDLg/pRRE	-	gag y gag/pol del VIH-1	Promotor CMV Elemento RRE	Dr. Trono
pRRL-IRES-EGFP	-	EGFP	Promotor CMV Secuencia IRES LTR 5', LTR 3' y señal ψ de empaquetamien to Elemento RRE	Dr. Trono
pRRL-IRES-EGFP ^{NotKO}	pRRL-IRES-EGFP	EGFP		Este trabajo
pRRL-Luc-IRES-EGFP	pRRL-IRES-EGFP	Luciferasa de <i>Photynus piralis</i>		
pRRL. ^{FLAG} -S2.10-CD8α- CD28-TCRζ-IRES- EGFP	pRRL. ^{FLAG} αNIP- CD8α-CD28-TCRζ -IRES-EGFP	scFv S2.10		
pRRL. ^{FLAG} -S3.109- CD8α-CD28-TCRζ - IRES-EGFP	pRRL. ^{FLAG} αNIP- CD8α-CD28-TCRζ -IRES-EGFP	scFv S3.109		
pRRL. ^{FLAG} -S3.45-CD8α- CD28-TCRζ-IRES- EGFP	pRRL. ^{FLAG} αNIP- CD8α-CD28-TCRζ -IRES-EGFP	scFv S3.45		
pRRL. ^{FLAG} -S3.97-CD8α- CD28-TCRζ-IRES- EGFP	pRRL. ^{FLAG} αNIP- CD8α-CD28-TCRζ -IRES-EGFP	scFv S3.97		
pRRL. ^{FLAG} αCEA-CD8α- CD28-TCRζ-IRES- EGFP	pRRL. ^{FLAG} αCEA- TCRζ- IRES-EGFP	CD8α-CD28- TCRζ		
pRRL. ^{FLAG} αCEA-CD8α- CD28-CD137-TCRζ	pRRL. ^{FLAG} αCEA- TCRζ- IRES-EGFP	CD8α-CD28- CD137-TCRζ		

Tabla II (c)	Vectores			
Vector	Vector de origen	Inserto	Características	Proveedor-Referencias
pRRL. ^{FLAG} α CEA-TCR ζ -IRES-EGFP	pRRL-IRES-EGFP _{NotK}	^{FLAG} .MFE23-TCR ζ -EGFP	Promotor CMV Secuencia interna de entrada del ribosoma (IRES) LTR 5', LTR 3' y señal ψ de empaquetamiento Elemento RRE	Este trabajo
pRRL. ^{FLAG} α NIP-CD8 α -CD28-TCR ζ -IRES-EGFP	pRRL. ^{FLAG} α NIP-TCR ζ -IRES-EGFP	CD8 α -CD28-TCR ζ		
pRRL. ^{FLAG} α NIP-TCR ζ -IRES-EGFP	pRRL. ^{FLAG} α CEA-TCR ζ -IRES-EGFP	scFv B1.8		
pRSVrev	-	rev del HIV-1	Promotor CMV	Dr. Trono
pVAC. α CEA-TCR ζ	-	MFE23- TCR ζ	Promotor RSV Amp ^R	LAV
pVAC. α NIP-TCR ζ _{Not/Xba}	pVAC. α NIP-TCR ζ	B1.8-TCR ζ		Este trabajo
pVAC. α NIP-TCR ζ	-	B1.8 TCR ζ		LAV
pVAC. ^{FLAG} α CEA-TCR ζ .	pVAC. ^{FLAG} α NIP-TCR ζ	^{FLAG} MFE23-TCR ζ		Este trabajo
pVAC. ^{FLAG} α NIP-TCR ζ	pVAC. α NIP-TCR ζ	^{FLAG} B1.8 TCR ζ		
pVAC. ^{FLAG} α NIP-TCR ζ _{Not/Xba}	pVAC. α NIP-TCR ζ -Not/Xba	^{FLAG} B1.8 TCR ζ		

1 MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Reino Unido

2 Dr. Álvarez-Vallina, Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, España

3 Virus de la estomatitis vesicular

4 Dr.Trono, École polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL), Lausana, Suiza

Tabla III	Oligonucleótidos utilizados para la generación de vectores
1	CCGGGGGGCCACTCCGACTACAAAGACGATGACGACAAGGCTAGCCAGGTGCAGCTGCA
2	GCTGCACCTGGCTAGCCTTGTGCTATCGTCTTTGTAGTCGGAGTGGGCCC
3	GCTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCT
4	CTCTGTAGCGGCCCGCCGTTT
5	CAGGAAACAGCTATGAC
6	TAAAACGACGGCCAG
7	ACAGATCTATGGACTGGACCTGGAGGGT
8	AAATGTCGACTTATTAGCGACGAGGGGGCAG
9	CAAGGCTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTC
10	GTAGCGGCCGCTCCTCGAGGACAGTCAGTTTGGT
11	GCCATGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTC
12	CATGGCCGCTAGCTGTACAGATATCGC
13	GGCCGCGATATCTGTACAGCTAGCGGC
14	GGGGCCCACTCCGACTACAAAGACG
15	CAGGCCAAAGCTCTGTGCCTCTGTA
16	GTAAAACGACGGCCAGT
17	ACAGGAACCAGCTATGACCATGAT
18	AAGCGGCTTCGGCCAGTAACG

Para construir el vector lentiviral pRRL.^{FLAG}αCEA.TCRζ-IRES-EGFP, el plásmido pVAC.αNIP.TCRζ se digirió con NotI-XbaI, se trató con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y se religó, para eliminar un sitio PstI (posición 1705), obteniéndose el plásmido pVAC.αNIP.TCRζ-Not/Xba. Este plásmido se digirió con XmaI-PstI para insertar una pareja oligonucleótidos alineados (oligonucleótidos 1 y 2) que contenía la secuencia codificante de la etiqueta peptídica FLAG (DYKDDDDK). De esta manera se obtuvo el vector pVAC.^{FLAG}αNIP.TCRζ^{Not/Xba}. Para obtener el vector pVAC.^{FLAG}αNIP.TCRζ, el vector pVAC.^{FLAG}αNIP.TCRζ^{Not/Xba} se digirió con HindIII-BstEII y el inserto obtenido se clonó en el vector pVAC.αNIP.TCRζ digerido con las mismas enzimas. El gen del scFv MFE23 (anti-CEA humano) (Chester *et al*, 1994) se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 3 y 4 a partir del vector pVAC.αCEA.TCRζ. La secuencia se verificó utilizando los oligonucleótidos 5 y 6. El producto de PCR se digirió con NheI-NotI y se clonó en el vector pVAC.^{FLAG}αNIP.TCRζ digerido con las mismas enzimas, para obtener el plásmido pVAC.^{FLAG}αCEA.TCRζ mediante la sustitución de la región codificante del scFv B1.8 por la del scFv MFE23. El vector pRRL-IRES-EGFP^{NotKO} se obtuvo mediante digestión con NotI, tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y religado. La secuencia codificante del ^{FLAG}αCEA.TCRζ se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pVAC.^{FLAG}αCEA.TCRζ utilizando los oligonucleótidos 7 y 8. El producto de PCR se digirió con BglII-SalI y se subclonó en el vector pRRL-IRES-EGFP^{NotKO} digerido con las enzimas BamHI-XhoI, obteniéndose el vector lentiviral pRRL.^{FLAG}αCEA.TCRζ-IRES-EGFP. La secuencia se verificó con los oligonucleótidos 14 y 18.

Para obtener el vector pRRL.^{FLAG}αNIP.TCRζ-IRES-EGFP, la región codificante del AcMo B1.8 (anti-NIP) en formato scFv se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 9 y 10, a partir del plásmido pVAC.αNIP.TCRζ. El producto de PCR se digirió con las enzimas NheI-NotI y se clonó en el vector pRRL.^{FLAG}αCEA.TCRζ-IRES-EGFP digerido con las mismas enzimas. La secuencia se verificó con los oligonucleótidos 14 y 15. El vector lentiviral pRRL-Luc-IRES-EGFP se generó mediante la inserción de un fragmento derivado del plásmido pGL3 Basic Vector con las enzimas NheI-XbaI, en el vector pRRL-IRES-EGFP digerido con la enzima XbaI. La orientación del inserto se comprobó mediante digestión con las enzimas XbaI-NotI.

Para generar el vector fagémido pHEN2.MFE23, la secuencia del scFv MFE23 se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pVAC. α CEA.TCR ζ , utilizando los oligonucleótidos 4 y 11. El producto de la PCR se clonó en el vector pCR2.1-TOPO, siguiendo las indicaciones del sistema “*TOPO TA Cloning*” (Life Technology). La secuencia se verificó con los oligos 16 y 17. Este plásmido intermedio se digirió con las enzimas NcoI-NotI y el fragmento se clonó en el vector pHEN2.B1.8, digerido con las mismas enzimas. El plásmido pAB2, se obtuvo introduciendo una pareja oligonucleótidos alineados (oligonucleótidos 12 y 13) que contenía un sitio de clonación múltiple (MCS, del inglés *multiple cloning site*) con las dianas de restricción NheI, BsRGI y EcoRV, en el vector pAB1 digerido con las enzimas NcoI-NotI.

Para obtener los vectores pAB2.S1.58 al pAB2.S3.193 (Tabla II), los scFvs de los distintos clones se extrajeron de los plásmidos intermedios pCR2.1-TOPO (ver apartado 8.2 y 9) mediante digestión con las enzimas NheI-NotI y se clonaron en el plásmido pAB2 previamente digerido con las mismas enzimas.

El plásmido pMA.CD8 α .CD28.TCR ζ fue sintetizado por Geneart AG (Alemania). Para obtener los plásmidos pRRL.^{FLAG} α CEA.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP y pRRL.^{FLAG} α NIP.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP, el vector pMA.CD8 α .CD28.TCR ζ se digirió con las enzimas NotI-BstBI, y el fragmento resultante de 744 pb (CD8 α .CD28.TCR ζ) se clonó en el vector pRRL.^{FLAG} α CEA.TCR ζ -IRES-EGFP y en el vector pRRL.^{FLAG} α NIP.TCR ζ -IRES-EGFP, digeridos con las mismas enzimas.

Los vectores pRRL.^{FLAG}S2.10.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP, pRRL.^{FLAG}S3.45.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP, pRRL.^{FLAG}S3.97.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP y pRRL.^{FLAG}S3.109.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP, se generaron mediante la inserción de los genes de los scFvs S2.10, S3.45, S3.97 y S3.109, obtenidos mediante digestión con NheI-NotI a partir de los vectores intermedios pCR2.1-TOPO S2.10, pCR2.1-TOPO S3.45, pCR2.1-TOPO S3.97 y pCR2.1-TOPO S3.109, en el vector pRRL.^{FLAG} α NIP.CD8 α .CD28.TCR ζ digerido con las mismas enzimas.

5. GENERACIÓN DE REPERTORIOS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES HUMANOS EN VECTORES LENTIVIRALES

5.1. REPERTORIO DERIVADO DE LA GENOTECA DE SCFVS HUMANOS GRIFFIN.1

La genoteca sintética Griffin.1 (MRC, Cambridge, Reino Unido) es un repertorio de anticuerpos recombinantes humanos en formato scFv clonados en un vector fagémido (pHEN2). La diversidad clonal teórica del repertorio es de 1×10^9 . El repertorio se creó mediante el reclonaje de los genes sintéticos (V_H y V_L) humanos de la genoteca Fab 2lox (Winter *et al*, 1994; Griffiths *et al*, 1994) en el vector fagémido pHEN2 (Griffiths *et al*, 1994; Hoogenboom *et al*, 1991). A partir de una preparación de ADN plasmídico de la genoteca Griffin.1, se realizó una digestión con ClaI-SfiI y la banda resultante se purificó, tras una electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión. Las regiones codificantes de los scFvs se amplificaron mediante PCR. Se realizaron 9 reacciones diferentes utilizando 9 oligonucleótidos cebadores degenerados (Tabla IV, oligonucleótidos n° 1 al n° 9) que hibridan en los extremos 5' relativamente conservados de las regiones V_H , y un oligonucleótido cebador universal (Tabla IV, oligonucleótido n° 11) que hibrida en el extremo 3' conservado. Los productos de las 9 PCRs se mezclaron y se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO, para obtener pCR2.1-Griffin. Se realizaron 10 electroporaciones (8 kv, 25 μ F, 200 Ω) de bacterias Electro Ten-Blue Cells (Stratagene) y la suspensión resultante se cultivó en 200 mL de medio líquido TYE suplementado con 50 μ g/mL de ampicilina toda la noche a 37 °C, para proceder a realizar una preparación de ADN plasmídico (Qiagen). La diversidad clonal del repertorio resultante se evaluó mediante análisis *fingerprinting*, usando la enzima BstNI, y secuenciación. Una alícuota de la mezcla de bacterias derivadas de las electroporaciones se almacenó a -80 °C en el medio de electroporación suplementado con un 20% (vol/vol) de glicerol. El fragmento resultante de la digestión de la genoteca pCR2.1- Griffin con las enzimas NheI-NotI, se clonó en el vector lentiviral pRRL.^{FLAG} α NIP.TCR ζ -IRES-EGFP digerido con las mismas enzimas, sustituyendo el scFv murino B1.8 (anti-NIP) por el repertorio de scFvs humanos derivado de la genoteca Griffin. De esta manera, se obtuvo la genoteca lentiviral pRRL.^{FLAG}Griffin.TCR ζ -IRES-EGFP, que codifica el repertorio de scFvs en el contexto de un CAR. Se realizaron 10 electroporaciones (1.8 kV, 25 μ F, 200 Ω) de bacterias Electro Ten Blue Cells con 2,5 μ g de la reacción de ligado. La suspensión bacteriana resultante de la mezcla de las 10 electroporaciones se procesó de la manera descrita anteriormente. La eficiencia de transformación del plásmido fue calculada con la siguiente fórmula:

(Número de colonias X dilución plaqueada X 10^6)/pg ADN utilizados

Considerando este dato y la proporción de clones contaminantes anti-NIP que se obtuvieron en la reacción de ligado control, a la que no se había añadido inserto, se calculó que el número de clones del repertorio Griffin.1 clonados en el vector lentiviral era de $1,5 \times 10^5$.

5.2. REPERTORIO DERIVADO DE LA GENOTECA DE scFVS HUMANOS TOMLINSON I+J

La genoteca sintética Tomlinson I+J (MRC, Cambridge, Reino Unido) es un repertorio de anticuerpos recombinantes humanos en formato scFv clonados en un vector fagémido (pIT2) (DeWildt *et al*, 2000). Se compone de dos repertorios, Tomlinson I y Tomlinson J, cada uno de ellos con una diversidad clonal teórica de $1,4 \times 10^8$. Todos los clones del repertorio están basados en una región marco V_H única (V3-23/DP-47 y JH4b) y en una región marco V_L única (Vκ :O12/O2/DPK9 y Jκ1), en las que la diversidad de los dominios de unión al antígeno se introdujo mediante mutagénesis dirigida por PCR en las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) CDR1, CDR2 y CDR3 (Christ *et al*, 2006).

Las regiones codificantes de los scFvs se amplificaron mediante PCR a partir de una preparación de una mezcla de ADN de las genotecas Tomlinson I y Tomlinson J, utilizando los oligonucleótidos cebadores 10 y 11. El producto de PCR se digirió con las enzimas NheI-NotI y se clonó en el vector lentiviral pRRL.^{FLAG}αNIP.TCRζ-IRES-EGFP digerido con las mismas enzimas, sustituyendo el scFv murino B1.8 (anti-NIP) por el repertorio de scFvs humanos derivado de la genoteca Tomlinson. De esta manera, se obtuvo el plásmido lentiviral pRRL.^{FLAG}Tomlinson.TCRζ-IRES-EGFP, que codifica el repertorio de scFvs en el contexto de un CAR. Se realizaron para ello 10 electroporaciones (1.8 kV, 25 μF, 200 Ω) de bacterias *Electro Ten Blue Cells*, con 750 ng de la reacción de ligado. La suspensión bacteriana resultante de la mezcla de las 10 electroporaciones se procesó de la manera descrita anteriormente. La diversidad teórica del repertorio obtenido fue de 1×10^5 clones.

5.3. REPERTORIO DERIVADO DE LA GENOTECA DE ANTICUERPOS HUMANOS MONODOMINIO (REPERTORIO DAb)

La genoteca sintética DAb (MRC, Cambridge, Reino Unido) es un repertorio de anticuerpos recombinantes humanos en formato V_H clonados un vector fagémido (pR2) Christ *et al*, 2007; Lee *et al*, 2007). Todos los clones del repertorio están basados en una región marco V_H única (V3-23/D47) en las que la diversidad de los dominios de unión al antígeno se introdujo mediante mutagénesis dirigida por PCR en las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) CDR1, CDR2 y CDR3 (Christ *et al*, 2006). La diversidad clonal teórica del repertorio es de 3×10^9 .

Las regiones codificantes de los anticuerpos V_H se amplificaron mediante PCR a partir de una preparación de ADN plasmídico de la genoteca DAb, utilizando los oligonucleótidos 10 y 12 (Tabla IV). El producto de la PCR se digirió con las enzimas NheI-NotI y se clonó en el vector lentiviral pRRL.^{FLAG}αNIP.CD8α.CD28.TCRζ-IRES-EGFP digerido con las mismas enzimas, sustituyendo el scFv murino B1.8 (anti-NIP) por el repertorio de anticuerpos V_H derivado de la genoteca DAb. De esta manera, se obtuvo el plásmido lentiviral pRRL.^{FLAG}DAb.CD8α.CD28.TCRζ-IRES-EGFP, que codifica el repertorio V_H en el contexto de un CAR. Se realizaron 20 transformaciones con cloruro cálcico de bacterias *XL10Gold Ultracompetent cells* (Stratagene) con 1,23 µg de la reacción de ligado. La suspensión bacteriana resultante de la mezcla de las 20 electroporaciones se procesó de la manera descrita anteriormente. La diversidad teórica del repertorio obtenido fue de $5,6 \times 10^5$ clones.

Tabla IV	Oligonucleótidos utilizados para la generación de repertorios de Acs
1	GCTAGCCAGRTGCAGCTGCTGCARTCTGG
2	GCTAGCSAGGTCCAGCTGCTRCAGTCTGG
3	GCTAGCCAGRTCACCTTGAAGGAGTCTGG
4	GCTAGCSAGGTGCAGGTGGTGGAGTCTGG
5	GCTAGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGWCYGG
6	GCTAGCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGG
7	GCTAGCCAGSTGCAGCTGCAGGAGTCSGG
8	GCTAGCGARGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
9	GCTAGCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG
10	CTACCGGCTAGCGAGGTGCAG
11	CTATGCGGCCCATTC
12	GAATTTTCTGTATGAGG

6. GENERACIÓN Y TITULACIÓN DE PARTÍCULAS

LENTIVIRALES:

Para obtener los *stocks* virales se transfectaron células 293T en placas de 100mm (5×10^6 células/placa), mediante precipitación con fosfato cálcico. Las cantidades de ADN plasmídico que se añadieron por placa fueron 14.1 mg de vector de transferencia (Tabla V), 9 mg del vector pMDLg/pRRE, 3.45 mg del vector pRSVrev y 4.71 mg del vector pMD.G. Tras 8 horas de incubación se retiró el medio de cultivo y se añadió medio completo fresco. A las 48 horas se recogió medio de cultivo, se filtró (0,45 mm) y se concentró 100 veces por ultracentrifugación durante 2 horas, 24.500 rpm a 22 °C. (9000 g; ultracentrífuga Beckman L-70 / Rotor SW60). El *pellet* viral se resuspendió en PBS y se almacenó a -80 °C. Para la titulación de las partículas virales se utilizaron dos métodos:

- Titulación de partículas físicas (PF/mL), mediante ELISA indirecto para la proteína de la cápside viral p24, siguiendo las instrucciones del proveedor (Endogen).
- Titulación biológica de partículas infectivas (Unidades transductoras, UT/mL), mediante la transducción de células HeLa, en placas de 24 pocillos ($2,5 \times 10^5$ células/pocillo), con diluciones seriadas de los *stocks* virales. A las 48 horas de la transducción, el porcentaje de células que expresaban la proteína verde fluorescente (EGFP, del inglés *enhanced green fluorescent protein*) se determinó mediante citometría de flujo. El título en UT/mL se calculó mediante la siguiente fórmula: (porcentaje de células EGFP positivas/100) x factor de dilución.

Tabla V	Vectores de transferencia génica
Lentivirus	Vector
LV ^{EGFP}	pRRL-IRES-EGFP
LV ^{αCEA.CAR-EGFP}	pRRL. ^{FLAG} α CEA.TCR ζ -IRES-EGFP
LV ^{Luc-EGFP}	pRRL-Luc-IRES-EGFP
LV ^{αCEA.CARv1-EGFP}	pRRL. ^{FLAG} α CEA.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP
LV ^{S2.10.CARv1-EGFP}	pRRL. ^{FLAG} S2.10.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP
LV ^{S3.45.CARv1-EGFP}	pRRL. ^{FLAG} S3.45.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP
LV ^{S3.97.CARv1-EGFP}	pRRL. ^{FLAG} S3.97.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP
LV ^{S3.109.CARv1-EGFP}	pRRL. ^{FLAG} S3.109.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP
LV ^{Griffin. CAR-EGFP}	pRRL. ^{FLAG} Griffin.TCR ζ -IRES-EGFP
LV ^{Dab.CARv1-EGFP}	pRRL. ^{FLAG} DAb.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP

7. MODIFICACIÓN GENÉTICA DE CÉLULAS HUMANAS

7.1. TRANSFECCIONES:

La línea celular T humana Jurkat (clón E6.1) se transfectó con el vector de expresión pCEP4. α NIP.TCR ζ , utilizando Superfect según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). Para la obtención de transfectantes estables, las células se seleccionaron en RPMI-C suplementado con higromicina B (400 mg/mL) (Life Technologies).

7.2. TRANSDUCCIONES:

Para la transducción de líneas celulares humanas con los *stocks* lentivirales (Tabla V), las células en crecimiento exponencial (1×10^5 células/pocillo) se incubaron durante toda la noche en placas de 96 pocillos de fondo plano (BD Biosciences), con distintas preparaciones virales concentradas, en un volumen final de 200 μ L de medio. Se utilizaron multiplicidades de infección (MDI) variables, entre 0,25 y 40. A continuación, las células se lavaron con PBS y se mantuvieron en cultivo durante un periodo adicional de 48 horas, antes de proceder a analizar por citometría de flujo, el porcentaje de células que expresaban EGFP, y/o CAR según el lentivirus empleado.

Para la transducción de las células Jurkat con el las genotecas lentivirales, las células (2×10^7) se centrifugaron durante 2 horas (1000 g, 32 °C) en 8 mL de RPMI-C, que contenía las partículas lentivirales (LV^{Griffin.CAR-EGFP} o LV^{Dab.CARv1-EGFP}) a una MDI de 1. Tras este proceso, las células se incubaron 48h a 37 °C antes de proceder a analizar por citometría de flujo, el porcentaje de células que expresaban EGFP, y/o CAR según el lentivirus empleado.

8. CITOMETRÍA DE FLUJO (CF)

Para realizar estudios fenotípico, las células fueron incubadas durante periodos de 30 minutos a 4 °C, con diluciones apropiadas de los Acs, sin conjugar o conjugados con ficoeritrina (PE) o con isotiocianato de fluoresceína (FITC). La expresión de CD66 (CEA) en líneas tumorales se estudió por inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando el AcMo anti-CEA humano, clon C6G9 (Sigma-Aldrich), y un segundo Ac de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC. La expresión en superficie de los CARs, que posee en su extremo amino-terminal la etiqueta peptídica FLAG, se estudió mediante IFI usando el AcMo anti-FLAG, clon M2 (Sigma-Aldrich) y un segundo Ac de cabra anti-IgG

F(ab')₂ de ratón conjugado con PE (Jackson Immuno Research). La expresión en superficie del CAR anti-NIP se estudió mediante inmunofluorescencia directa (IFD) utilizando un Ac de cabra anti-cadena ligera lambda (l) de Ig de ratón conjugado con FITC (Southern Biotechnology Associates). La cantidad relativa del hapteno NIP conjugado en la superficie de las celular, se estimó mediante IFI usando cantidades saturantes del scFv B1.8 purificado, el AcMo anti-c-myc, clon 9E10 (Abcam) y un Ac de cabra anti-IgG F(ab')₂ de ratón conjugado con PE. Para la expresión del marcador de activación temprana CD69, se realizó una IFD usando el AcMo anti-CD69 humano, clon FN50 (BD Biosciences) conjugado con PE. La expresión del antígeno de superficie leucocitario CD45, se evaluó mediante IFD utilizando un AcMo anti-CD45 humano, clon MEM28, conjugado con PE (Immunotools). La especificidad de los Acs S2.10, S3.45, S3.97 y S3.109 se evaluó mediante IFI tras la incubación con el scFv correspondiente purificado, el AcMo anti-c-myc, clon 9E10 y el Ac de cabra anti-IgG F(ab')₂ de ratón conjugado con PE. Los estudios se realizaron en un EPICS XL (Coulter Electronics, Hialeah, FL, EE.UU.) equipado con un láser de argón (488nm).

9. ESTUDIOS FUNCIONALES

9.1. ENSAYOS DE ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T

9.1.1. ENSAYOS DE ACTIVACIÓN CON PROTEÍNAS PURIFICADAS

La proteínas purificadas [CEA humano (Sigma-Aldrich) o el AcMo anti-CD3 humano, clon SPVT3b (Zymed)], se inmovilizaron sobre placas de 96 pocillos de fondo redondo (Falcon, BD Biosciences) mediante una incubación de 16 horas a 4 °C en PBS (10 µg/mL). Posteriormente, las placas se lavaron con PBS, se bloquearon con RPMI-C durante 1 hora a 37 °C y se añadieron células Jurkat (10⁵ células/pocillo). Tras 16 horas de incubación a 37 °C, se recogió el sobrenadante de cultivo y la interleuquina-2 (IL-2) se cuantificó mediante ELISA. Las células se recogieron para estudiar la el nivel de expresión de CD69 mediante CF.

9.1.2. ENSAYOS DE ACTIVACIÓN CON CÉLULAS DIANA

9.1.2.1. ENSAYOS A DE ACTIVACIÓN A PEQUEÑA ESCALA

Células efectoras Jurkat, Jurkat^{EGFP}, Jurkat^{αCEA.CAR}, Jurkat^{αCEA.CARv1}, Jurkat^{αNIP}, Jurkat^{Griffin.CAR}, Jurkat^{S2.10.CARv1}, Jurkat^{S3.45CARv1}, Jurkat^{S3.97.CARv1}, Jurkat^{S3.109.CARv1},

Jurkat^{DAb. CARv1}, o combinaciones de las mismas (5×10^4 células/pocillo), se mezclaron con distintos tipos de células diana (HeLa, HeLa^{CEA}, HeLa^{NIP}, HT1080, MDA-MB231, MKN45 o K562), a distintas relaciones efector:diana (E:D) en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Falcon, BD Biosciences). Las placas se centrifugaron durante 1 minuto a 123 g para favorecer el contacto celular y se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Tras este periodo de tiempo se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la secreción de IL-2 mediante ELISA. Para estudiar el nivel de expresión de CD69 el *pellet* celular se disgregó con una solución de Tris-EDTA (1.0 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M EDTA, Sigma-Aldrich), y se analizó mediante CF.

9.1.2.2. ENSAYOS A DE ACTIVACIÓN A MEDIA ESCALA

Células efectoras Jurkat, Jurkat^{EGFP}, Jurkat^{αCEA.CAR}, Jurkat^{αNIP.CAR}, o Jurkat^{Griffin.CAR}, o combinaciones de las mismas (5×10^6 células) se incubaron en frascos de 25 cm³ (Falcon, BD Biosciences), sobre monocapas de células diana (HeLa o HeLa^{CEA}), a una relación E:D 1:1. Tras 16 horas las células efectoras se recuperaron, tratando la mezcla con una solución de Tris-EDTA, tras lo cual se lavaron con PBS y se procedió a estudiar el nivel de expresión de CD69 mediante CF.

9.2. ENSAYOS A DE ACTIVACIÓN-SELECCIÓN CON CÉLULAS DIANA

Células efectoras Jurkat, Jurkat^{αCEA.CAR}, Jurkat^{αNIP.CAR}, Jurkat^{Griffin.CAR}, o combinaciones de las mismas (3×10^7 células) se incubaron en frascos de 125 cm³ (Falcon, BD Biosciences), sobre monocapas de células diana (HeLa o HeLa^{CEA}) a una relación E:D 1:1. Tras 16 horas las células efectoras se recuperaron, tratando la mezcla con una solución de Tris-EDTA, tras lo cual se procedió a realizar una centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque TM PLUS (GE Healthcare). Las células se incubaron con el AcMo anti-CD69 conjugado con PE (clón FN50) para proceder a su análisis por CF y posterior separación con un CF separador *FACSVantage cell sorter* (BD Biosciences), en base a la co-expresión de EGFP y CD69. Las células seleccionadas se expandieron *in vitro* para proceder a su caracterización molecular, o a la realización de nuevas rondas de activación-selección.

10. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Para la caracterización molecular se extrajo ARN total de 5×10^4 células Jurkat ^{α NIP.CAR}, o Jurkat^{Griffin.CAR} pre-selección y post-selección, siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). El cDNA se sintetizó utilizando el *kit “1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)”* de Roche siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia codificante del scFv MFE23 o de los scFvs de los repertorios pre-selección y post-selección, se amplificaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 14 y 15 (Tabla III) y se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO. En una serie de colonias, seleccionadas aleatoriamente de las placas maestras, se realizaron estudios de huella de ADN (en inglés, *DNA fingerprinting*) y secuenciación.

10.1. ESTUDIOS DE *FINGERPRINTING*

Los estudios de huella de ADN se realizaron mediante el empleo de una enzima de restricción de corte frecuente. Para ello, se realizaron 50 PCRs de colonias seleccionadas aleatoriamente de las placas maestras, con los oligonucleótidos 16 y 17 (Tabla III), y el producto resultante se digirió con la enzima BstNI y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los clones se clasificaron según el patrón de digestión.

10.2. ESTUDIOS DE SECUENCIACIÓN

Hasta 200 colonias, seleccionados aleatoriamente a partir de las placas maestras, se emplearon para realizar estudios de secuenciación. Para ello, se realizó una PCR con los oligonucleótidos 16 y 17 (Tabla III), y el producto se secuenció usando el método de los dideoxinucleótidos y un secuenciador de ADN automático ABI-PRISM (Perkin Elmer).

Para la expresión de AcRs se transformaron bacterias *E. coli* TG1 con cada uno de los 29 plásmidos [pAB1.S1.58 al pAB1.S3.193 (Tabla II)],

11. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para la expresión de AcRs se transformaron bacterias *E. coli* TG1 con cada uno de los 29 plásmidos obtenidos de la selección del repertorio Griffin [pAB1.S1.58 al pAB1.S3.193 (Tabla II)], o con pAB1.MFE23. Se cultivaron colonias individualizadas de

bacterias transformadas en medio 2xTY, suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y 0,1% de glucosa, en agitación durante 4 horas a 37 °C. Entonces se añadió isopropil β-D-tiogalactósido (IPTG) (1 mM) y el cultivo continuó en agitación durante 16 horas a 25 °C. Para la purificación de AcRs se transformaron bacterias *E. coli* TG1 con los plásmidos pAB1.S2.10, pAB1.S3.45, pAB1.S3.97, pAB1.S3.109, pAB1.B1.8 o pAB1.MFE23. Se cultivaron colonias individualizadas de bacterias transformadas en medio 2xTY, suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y 0,1% de glucosa, en agitación durante 4 horas a 37 °C. Entonces 1 mM IPTG y el cultivo continuó en agitación durante 3 horas a 25 °C. Los AcRs se purificaron a partir de preparaciones de las fracciones osmótica y periplásmica del cultivo bacteriano mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) (HisTrap HP, GE Healthcare). Las proteínas purificadas se dializaron frente a PBS y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Todos los AcRs se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y ELISA.

12. ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS EN FASE SÓLIDA (ELISA)

12.1. ELISA PARA LA TITULACIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES

La titulación de partículas físicas (PF/mL) se realizó mediante ELISA, empleando un kit comercial (Endogen) frente a p24, la principal proteína de la nucleocápside del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). La curva se realizó utilizando p24 recombinante purificada (Jena Biosciences).

12.2. ELISA PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE INTERLEUQUINA-2

El sobrenadante de cultivo de células Jurkat, activadas durante 16 horas con proteína purificada o con células diana, se recogió y se utilizó para cuantificar la secreción IL-2 mediante ELISA, empleando un kit comercial (Endogen). La curva de concentraciones se realizó utilizando IL-2 humana purificada (Sigma-Aldrich).

12.3. ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FUNCIONALES

12.3.1. ELISA CON PROTEÍNA PURIFICADA

El CEA humano se obtuvo de ProspecTany. Para la generación de conjugados de seroalbúmina bovina (BSA) con el hapteno NIP en una relación molar 10:1 (NIP₁₀-BSA), se siguió un protocolo anteriormente descrito (Reth *et al*, 1979). Las proteínas se inmovilizaron sobre placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) mediante una incubación de 16 horas a 4 °C en PBS (10 µg/mL). Posteriormente las placas se lavaron con PBS y se bloquearon con PBS-4% BSA durante 2 horas a 37 °C se añadieron los scFv purificados (scFv MFE23 y scFv B1.8) de preparaciones bacterianas. Los scFvs unidos al antígeno se detectaron con el AcMo anti-c-myc, clon 9E10 (4 µg/mL) y posteriormente con un Ac de cabra anti-IgG de ratón (dilución 1/5000) conjugado con HRP (Amersham).

12.3.2. ELISA CON CÉLULAS DIANA FIJADAS

Las células diana (HeLa o HeLa^{CEA}) se sembraron (2,5 x 10⁴ células/pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo plano (Falcon, BD Biosciences) y se cultivaron durante toda la noche en 200 µL de su medio correspondiente para establecer una monocapa. Posteriormente las placas se lavaron con PBS y se procedió a fijar la monocapa mediante secado durante 1 h con una fuente de aire caliente situada a 30 cm. Tras la fijación las placas se bloquearon con PBS-4% leche en polvo desnatada (LPD) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se añadieron los sobrenadantes de cultivo bacteriano, preparaciones osmóticas, preparaciones periplásmicas o los scFvs purificados, diluidos al 50% (v/v) con PBS-4% LPD en un volumen final de 100 µL y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación orbital (100 rpm). Posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS, y los scFvs unidos a las células se detectaron con el AcMo anti-c-myc, clon 9E10 y con un Ac de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP. La lectura colorimétrica se realizó a 492 nm, sustrayendo la señal residual a 620 nm, tras la adición de dihidrocloruro de O-fenilenediamina (del inglés o-Phenylenediamine dihydrochloride, OPD) (Sigma-Aldrich).

13. TRANSFERENCIA WESTERN

Las muestras (AcR purificado, sobrenadante de cultivo bacteriano o fracciones osmótica y periplásmica) se analizaron mediante SDS-PAGE utilizando geles con un gradiente de 4-20% (Life Technologies). A continuación, las proteínas fueron transferidas por *electroblotting* a una membrana de nitrocelulosa, utilizando el sistema “iBlot® Western Blotting System” y los reactivos del kit “iBlot®Gel Transfer Stacks Nitrocellulose” (Life Technologies). La membrana fue bloqueada con *Odyssey Blocking Buffer* (Li-COR Biosciences), durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas, que presentaban una etiqueta peptídica *myc*, se detectaron con el AcMo anti-c-myc (1 µg/mL) diluido en solución de bloqueo, durante 1 hora. Tras varios lavados con PBS-0,05% Tween20 y con PBS, la membrana se incubó durante 30 minutos, con un Ac de burro anti-IgG de ratón conjugado con IRDye800 (Rockland), un fluorocromo con emisión cercana al infrarrojo (NIR), diluido en solución de bloqueo (1/15000). Tras lavar la membrana con PBS-0,05% Tween20 y PBS las bandas se visualizaron mediante el sistema de detección de fluorescencia y quimioluminiscencia *Odyssey® Infrared Imaging system* (Li-COR Biosciences).

14. ESTUDIOS *IN VIVO*

Los protocolos utilizados para la manipulación de animales, que se describen a continuación, han sido aprobados por el Comité de Ética Animal del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda y por el Comité de Ética Animal de la Clínica Mayo. Se utilizaron ratones hembra de seis semanas de edad de la línea Hsd:Athymic Nude-Foxn1tm (Harlan Ibérica).

14.1. ANESTESIA

Los ratones utilizados en este trabajo se anestesiaron por vía inhalatoria con isoflurano (Abbott Laboratories) vaporizado en oxígeno y se mantuvieron en ambiente estéril para la realización de los protocolos de implantación vía subcutánea (s.c.) de tumores, y para la administración vía intravenosa (i.v.), intratumoral (i.t.) o intracardiaca (i.c.), de células T. Para la realización de los ensayos de imagen molecular se indujo anestesia a largo plazo, mediante la inyección s.c. de una solución salina con ketamina (97,5 µg/g de peso), atropina (8 ng/g de peso) y diazepam (7,5 µg/g de peso).

14.2. IRRADIACIÓN DE LOS ANIMALES

La irradiación general con dosis subletales (400 cGy) se realizó con los ratones no anestesiados, empleando una unidad de Cobalto Theratron 780 Co₆₀ (AECL), 24 horas antes de la inoculación s.c. de los de los tumores, o de los implantes vasculares-tumorales. Para la irradiación local, los ratones no anestesiados se inmovilizaron sobre una superficie de poliestireno y se estableció una región de 1,8 cm de anchura en la zona ventral-media del animal, aproximadamente a una distancia de 1 cm de la base de la cola. El resto del cuerpo del animal se protegió con una capa de 2 mm de plomo. Sobre la región establecida se realizó la irradiación con una fuente de electrones de 4MeV generada por un acelerador lineal SL18 LINAC (Elekta), recibiendo el animal una dosis de irradiación total de 20 Gy, a una velocidad de 400 UM/minuto. La fuente de electrones se situó a 100 cm de la superficie del animal, sobre el cual se colocó una capa de poliestireno equivalente a 8 mm de agua para asegurar el 100% de la dosis de irradiación en la superficie del animal. La dosis calculada, a 0,5 cm de la superficie corporal, fue un 85% de la irradiación emitida. La dosis de irradiación de salida en la región dorsal del animal se estableció en el 0,5% de la dosis total. En los ratones irradiados localmente los implantes tumorales, o vasculares-tumorales se establecieron 5 días después de la irradiación.

14.3. ENSAYOS DE IMPLANTACIÓN TUMORAL:

XENOTRANSPLANTE CONVENCIONAL

Las células tumorales (HeLa) se resuspendieron en PBS conteniendo un 20 % de matriz extracelular (Matrigel™ BM Matrix, BD Biosciences), y se inocularon (2 x 10⁶ células en 100 mL) por vía s.c. en la zona dorsal. Los tumores se midieron cada dos días y el volumen tumoral se determinó según la fórmula: ancho² x largo x 0,52 (tomándose la medida más pequeña como ancho). El análisis estadístico de las medidas de crecimiento tumoral entre los diferentes grupos se realizó utilizando la prueba *t-Student*. El nivel de significación estadística se situó en p ≤ 0,05.

14.4. ENSAYOS DE IMPLANTACIÓN TUMORAL:

XENOTRANSPLANTE HUMANIZADO

Las células tumorales HT1080 (3 x 10⁵), las mezclas de células humanas primarias [HUVEC^{Luc-EGFP} (3 x 10⁵) y MSC (7,5 x 10⁴)], o las mezclas de células tumorales y células

humanas primarias [HT1080 (3×10^5), HUVEC^{Luc-EGFP} (3×10^5) y MSC ($7,5 \times 10^4$)], fueron resuspendidas en 200 μ L de Matrigel™ diluido en PBS (8 mg/mL) y suplementado con heparina (128 U/mL) (Sigma-Aldrich), factor de crecimiento del endotelial vascular (VEGF) humano (50 ng/mL), y factor de crecimiento de fibroblastos (hFGF) humano (150 ng/mL) (ambos de PeproTech). Los implantes se inocularon por vía s.c. en la zona ventral.

1 4.5. ENSAYOS DE IMAGEN MOLECULAR

Las imágenes de bioluminiscencia (BLI) *in vivo* se obtuvieron a diferentes días tras la implantación, utilizando un sistema Hamamatsu dotado de una cámara digital de alta resolución con dispositivos de cargas acopladas (CCD) ORCA-2BT (Hamamatsu Photonics). Para el análisis y procesamiento de las imágenes se empleó el software Wasabi (Hamamatsu Photonics). El sustrato del gen de la luciferasa de *Photinus pyralis* (Fluc), la sal de potasio D-Luciferina, se disolvió en PBS a una concentración de 17,5 mg/mL, y se inoculó por vía intraperitoneal (i.p.) 10 minutos antes de la adquisición de las imágenes de BLI, a una concentración de 125 mg/kg (150-200 μ L/ratón). Para un ensayo típico se toma primero una imagen de BLI con un tiempo de exposición de 1 minuto. La imagen se recoge con una ganancia media y un agrupamiento de píxeles en formato de 8 x 8. A continuación se toma una imagen con luz visible y un tiempo de exposición de 20 milisegundos., recogiendo la imagen con una ganancia media y un agrupamiento de píxeles (*binning*) en formato de 1x1. Por último, se mezclan las imágenes para obtener la composición final. El procesamiento incluye una coloración a escala siguiendo un perfil de intensidad de señal. Para la cuantificación de la señal, las regiones de interés son acotadas y la intensidad media de luz (intensidad total/superficie) es cuantificada y registrada. En todas las representaciones gráficas se muestran las medias de las intensidades y el error estándar del grupo. Fueron realizadas una media de 6 adquisiciones de BLI por animal y día tras la inoculación del sustrato para determinar el pico de emisión de fotones.

1 4.6. SELECCIÓN *IN VIVO* DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Para los ensayos de selección *in vivo* en ratones Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}, portadores de xenotransplantes s.c. convencionales derivados de células HeLa (volumen

promedio entre 0,2 y 0,3 cm³), las células Jurkat (control no transducidas o Jurkat^{DAb}. CARv1) se inocularon por 3 vías diferentes:

14.6.1. INOCULACIÓN INTRAVENOSA

Se realizaron 2 inoculaciones por vía i.v., de 2×10^6 células Jurkat resuspendidas en 100 µL de PBS, separadas por un intervalo de 24 horas. Los animales se sacrificaron 24 horas después de la segunda inoculación para proceder a la extracción de los tumores y de los órganos.

14.6.2. INOCULACIÓN INTRACARDIACA

Se realizó una inoculación por vía i.c., de 1×10^7 células Jurkat resuspendidas en 100 µL de PBS. Los animales se sacrificaron a las 24 horas y a los 6 días para proceder a la extracción de los tumores y de los órganos.

14.6.3. INOCULACIÓN INTRATUMORAL

Se realizó una inoculación por vía i.t. (en varios puntos del tumor), de 2×10^6 células Jurkat resuspendidas en 50 µL de PBS. Los animales se sacrificaron a distintos tiempos tras la inoculación (30 minutos, 24 horas, día 4 y día 7) para proceder a la extracción de los tumores y de los órganos.

14.6.4. RECUPERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS SELECCIONADAS

A los tiempos indicados los ratones se sacrificaron y se procedió a la extracción de los tumores, así como de los pulmones, hígado, bazo, y ganglios linfáticos. Una parte de los tejidos se almacenó a -80 °C. El resto se disgregó mecánicamente utilizando filtros de nylon de 40 µm y 100 µm de poro (BD Falcon). Las suspensiones celulares se lavaron varias veces (229 g, 5 minutos a 4 °C) con PBS. Una alícuota de las suspensiones celulares obtenidas de los tumores, se resuspendió en 3 mL de RPMI-C suplementado con IL-2 (1000 U/mL), para facilitar su expansión *in vitro*. Las células Jurkat se separaron de las células tumorales mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque TM PLUS. Alícuotas de la suspensiones celulares, obtenidas de los tumores y de los órganos, así como alícuotas de sangre, se trataron con una solución de lisis para eritrocitos (ACK

Lysing Buffer, LONZA), durante 3 minutos, se lavaron 1 vez (229 g, 5 minutos a 4 °C) con medio RPMI-C y otra vez con PBS. Para la detección y cuantificación de las células T las suspensiones celulares se marcaron con el AcMo anti-CD3 humano, clon OKT3, conjugado con PE (eBioscience) o con el AcMo anti-CD45 humano, clon MEM28, conjugado con PE (Immunotools).

15. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Las muestras tisulares se fijaron con formalina al 10% (pH 7,0) y se embebieron en parafina. Los cortes histológicos procedentes de cada tumor se tiñeron con hematoxilina y eosina y se visualizaron (x5) para identificar estructuras vasculares.

15.1. ANÁLISIS DEL ORIGEN VASCULAR POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Para la caracterización inmunohistoquímica (IHC), se procedió a desenmascarar los antígenos mediante tratamiento con calor en una olla a presión durante 4 minutos. en una solución de tampón citrato a pH 6,0 (*Target Retrieval Solution*, Dako). La actividad peroxidada endógena se bloqueó durante 5 minutos, utilizando una solución de peróxido de hidrógeno al 3%. Las estructuras vasculares humanas se identificaron con el AcMo anti-CD34 humano, clon QBEnd10 (Dako), utilizando el *kit “Mouse on Mouse (M.O.M.TM) peroxidase”* de Vector Laboratories. Para la detección de las estructuras vasculares murinas se utilizó el AcMo anti-CD34 murino, clon MEC14.7 (Immunotools) utilizando el *kit “Vectastain® ABC for rat IgG”* (Vector Laboratories). Como sustrato cromogénico en ambos casos se utilizó DAB (Vector Laboratories) seguido de contratinción con hematoxilina.

15.2. ANÁLISIS DE LA DENSIDAD VASCULAR

Los vasos funcionales o maduros se definieron como estructuras vasculares que contenían eritrocitos en su interior. La cuantificación se realizó analizando las áreas de densidad vascular alta (*“hot spots”*) a pequeño aumento (x50), y contando los vasos maduros en cuatro campos visuales, elegidos al azar en 10 secciones por ratón teñidas con hematoxilina y eosina.

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba *U de Mann-Whitney*. Se

realizaron tests biparamétricos y el nivel de significación estadística se situó en $p \leq 0,05$. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa informático SPSS 14.0 (SPSS). Para el recuento de vasos humanos y de vasos murinos, 4 secciones por ratón marcadas con el AcMo anti-CD34 humano o con el AcMo anti-CD34 murino se analizaron, primero a pequeño aumento (x50) para localizar *hot spots* y luego a mayor aumento (x200). En cada sección se evaluaron 5 campos visuales elegidos aleatoriamente. Las áreas vasculares se definieron como zonas teñidas con DAB, independientemente de la presencia de lumen vascular.

RESULTADOS

“Es cierto que los resultados de la Ciencia ni significan a los hombres ni los enriquecen, pero sí lo hace el trabajo intelectual, tanto productivo como receptivo, que es el esfuerzo por comprender.”

Mi visión del mundo

Mein Weltbild

(Albert Einstein)

1. DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UNA PLATAFORMA DE SELECCIÓN DE ANTICUERPOS BASADA EN LA ACTIVACIÓN CÉLULAR DE LINFOCITOS T

1.1. DISEÑO DE CONSTRUCCIONES GÉNICAS PARA LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES QUIMÉRICOS DE ACTIVACIÓN (CAR)

1.1.1. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR LENTIVIRAL QUE CODIFICA UN CAR CON ESPECIFICIDAD ANTITUMORAL

Con el objetivo de generar un modelo para validar la plataforma de selección de anticuerpos recombinantes humanos basada en la activación de células T (Plataforma SALT), se construyó el vector lentiviral pRRL^{FLAG}αCEA.TCRζ.IRES-EGFP a partir del vector pRRL.IRES-EGFP (Naldini *et al*, 1996). Este vector, derivado del virus de la inmunodeficiencia adquirida humana-1 (VIH-1), posee las secuencias necesarias para la replicación en bacterias y los elementos para el empaquetamiento en viriones (LTR 5', LTR 3' y señal ψ de empaquetamiento) (Figura 7). El vector pRRL^{FLAG}αCEA.TCRζ.IRES-EGFP incorpora en una única unidad transcripcional el gen del CAR, bajo el control del promotor CMV y el gen marcador de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP, del inglés *Enhanced Green Fluorescent Protein*) bajo el control de la secuencia IRES del virus EMCV. El CAR está formado por los genes V_H y V_L del scFv MFE23, que reconoce el antígeno carcinoembrionario (CEA) humano, fusionado a la región transmembrana y citoplásmica de la cadena ζ del complejo TCR-CD3 (Figura 7). La construcción incorpora la etiqueta peptídica FLAG para facilitar su detección en la superficie celular mediante citometría de flujo.

Para la producción de las partículas virales, la línea celular 293T se cotransfectó de forma transitoria con el vector lentiviral de interés (pRRL.IRES-EGFP o pRRL^{FLAG}αCEA.TCRζ.IRES-EGFP) y con tres plásmidos de empaquetamiento (pMD.G, pMDLg/pRRE y pRSVrev) que aportan, en *trans*, las proteínas estructurales y replicativas necesarias para la producción de lentivirus. Las partículas lentivirales (LV^{EGFP} o LV^{αCEA.CAR-EGFP}) se concentraron a partir de medio condicionado mediante ultracentrifugación y se procedió a la titulación de las partículas físicas (PP) y a la

titulación biológica. En el caso de las PP, el título obtenido para ambos vectores lentivirales se encontraba en el rango 1×10^7 - 1×10^8 PP/ml, mientras que en el caso de la titulación biológica se obtuvieron títulos de 2×10^7 UT/ml y 4×10^7 UT/ml respectivamente.

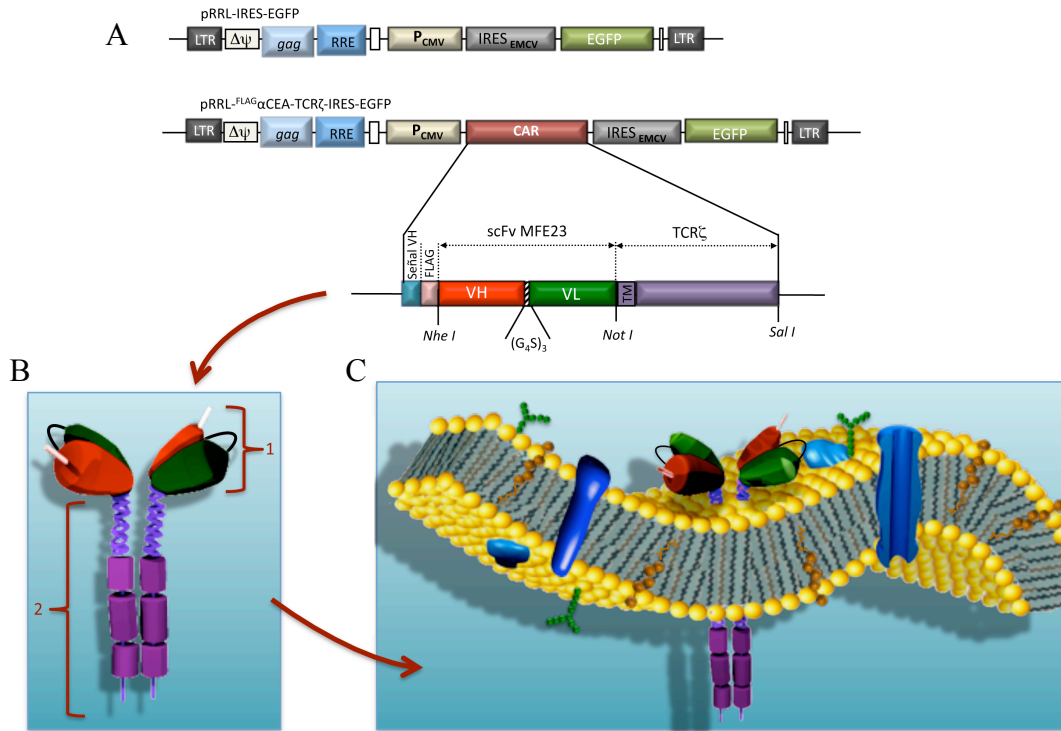


Figura 7: Representación esquemática de los vectores lentivirales, de la estructura de un CAR de primera generación, y del proceso de activación linfocitaria mediado por la ocupación del CAR. (A) Esquema de las construcciones lentivirales pRRL.IRES-EGFP y pRRL^{FLAG}αCEA.TCRζ.IRES-EGFP. LTR, repeticiones terminales largas (del inglés *long terminal repeats*) necesarias para el empaquetamiento de viriones e integración en el genoma de la célula; Δψ, señal ψ de empaquetamiento; RRE, elemento de respuesta a Rev; CMV, promotor constitutivo de citomegalovirus; EMCV IRES, sitio interno de entrada del ribosoma del virus de la encefalomiocarditis; gag, gen de proteína empaquetadora de las partículas virales; EGFP, gen de la proteína verde fluorescente; CAR, receptor de antígeno quimérico. (B) El CAR está estructurado en dos partes: el segmento de unión al antígeno (1), compuesto por el scFv MFE23 (anti-CEA) y el segmento transmembrana/transductor de señal (2), compuesto por las porciones transmembrana y citoplásmica de la cadena ζ del complejo TCR-CD3. (C) Representación del CAR integrado en la membrana plasmática celular.

1.1.2. TRANSDUCCIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR T HUMANA CON UN VECTOR LENTIVIRAL QUE CODIFICA UN CAR CON ESPECIFICIDAD ANTITUMORAL

La línea celular T humana Jurkat se utilizó como sistema modelo para estudiar la expresión de un CAR anti-CEA, y evaluar su potencial para inducir activación celular específica en respuesta a la ocupación del CAR. Con el objetivo de estudiar la permisividad del sistema, células Jurkat se infectaron con el lentivirus LV^{EGFP} a distintas MDIs. Como podemos observar en la Figura 8A, el sistema tiene una alta eficiencia transducción, de modo que una MDI de 1 permite unos niveles de expresión adecuados con un número de copias virales/célula bajo. A la vista de tales resultados, las células Jurkat se transdujeron con los lentivirus (LV^{EGFP} o $LV^{\alpha CEA.CAR-EGFP}$) a una MDI de 1.

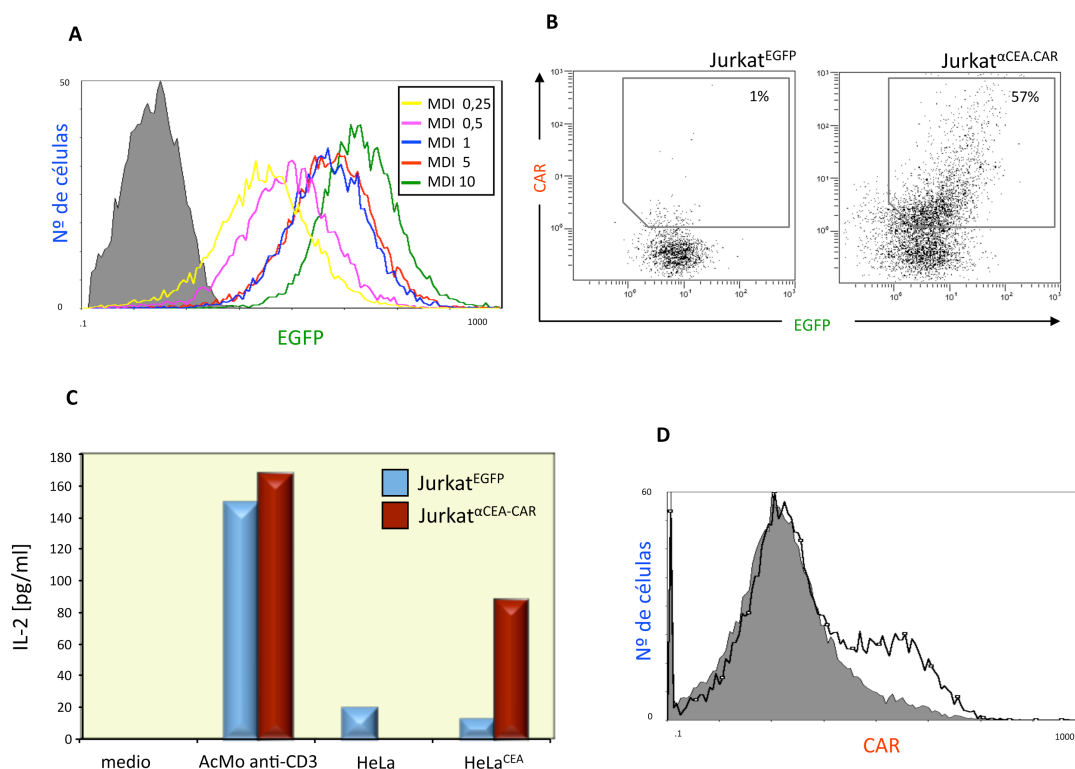


Figura 8: Análisis fenotípico y/o funcional de las células Jurkat^{EGFP}, Jurkat^{αCEA.CAR} y Jurkat^{αNIP.CAR} (A) Análisis por CF de la expresión de EGFP tras la transducción de células Jurkat con el LV^{EGFP} a diferentes MDIs en un rango de 0,25 a 10. (B) Análisis de la expresión de EGFP, y de CAR mediante CF (IFI), tras la transducción de células Jurkat con el $LV^{\alpha CEA.CAR-EGFP}$ a una MDI de 1. (C) Producción de IL-2 por las células Jurkat^{EGFP} y Jurkat^{αCEA.CAR} estimuladas con el AcMo anti-CD3 o células diana (HeLa o HeLa^{CEA}; E:D = 1:1). (D) Análisis de la expresión del CAR mediante CF (IFD), tras la transfección de células Jurkat con pCEP4.αNIP.TCRζ.

El análisis por citometría de flujo de las células transducidas, (Jurkat^{EGFP} y Jurkat^{αCEA.CAR}), reveló que en ambos casos más de un 95% de las células expresaban EGFP (Figura 8B).

1.1.2.1. EXPRESIÓN EN LA SUPERFICIE CELULAR

Para comprobar la expresión en superficie del CAR anti-CEA, las células Jurkat^{αCEA.CAR} se marcaron con el AcMo anti-FLAG M2, conjugado con PE. El análisis por citometría de flujo demostró que aproximadamente un 60% de las células presentaba niveles apreciables de CAR, siendo destacable la considerable heterogeneidad en los niveles de expresión (Figura 8B). La diferencia entre los niveles y los patrones de expresión del CAR anti-CEA y de la EGFP y podrían atribuirse a la diferente localización intracelular de ambas proteínas, así como a la diferente sensibilidad de los sistemas de detección.

1.1.2.2. ACTIVACIÓN CELULAR MEDIADA POR LA OCUPACIÓN DEL CAR

Para comprobar la especificidad y la funcionalidad del CAR anti-CEA se cultivaron poblaciones de células Jurkat^{EGFP} o Jurkat^{αCEA.CAR}, con células CEA⁻ (HeLa) o CEA⁺ (HeLa^{CEA}) y, tras un periodo de incubación de 16 horas, se analizó el nivel de IL-2 en el sobrenadante de cultivo. Como se indica en la Figura 8C, el CAR anti-CEA fue capaz de activar a las células Jurkat frente a las células HeLa^{CEA}, pero no tenía efecto cuando se emplearon células que no expresaban CEA. No se detectó secreción de IL-2 cuando poblaciones de células Jurkat^{EGFP} se cultivaron con células CEA⁻ o CEA⁺. Ambas poblaciones celulares (Jurkat^{EGFP} o Jurkat^{αCEA.CAR}) secretaron niveles similares de IL-2, en respuesta a la activación con un AcMo anti-CD3 inmovilizado (Figura 8C).

1.1.3. GENERACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE CÉLULAS T QUE EXPRESAN UN CAR NO TUMOR ESPECÍFICO

Con este objetivo células Jurkat se transfectaron con el vector de expresión episomal pCEP4.αNIP.TCRζ, que codifica un CAR formado por los genes V_H y V_L del scFv B1.8, que reconoce el hapteno NIP, fusionado a la región transmembrana y citoplásmica de la cadena ζ del complejo TCR-CD3 humano. La expresión en superficie de este CAR anti-NIP se comprobó mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo que reconoce la cadena Ig lambda (λ) de ratón, conjugado con PE (Figura 8D). Aproximadamente un

30% de las células transfectadas (Jurkat^{αNIP.CAR}) expresaban el CAR anti-NIP en superficie.

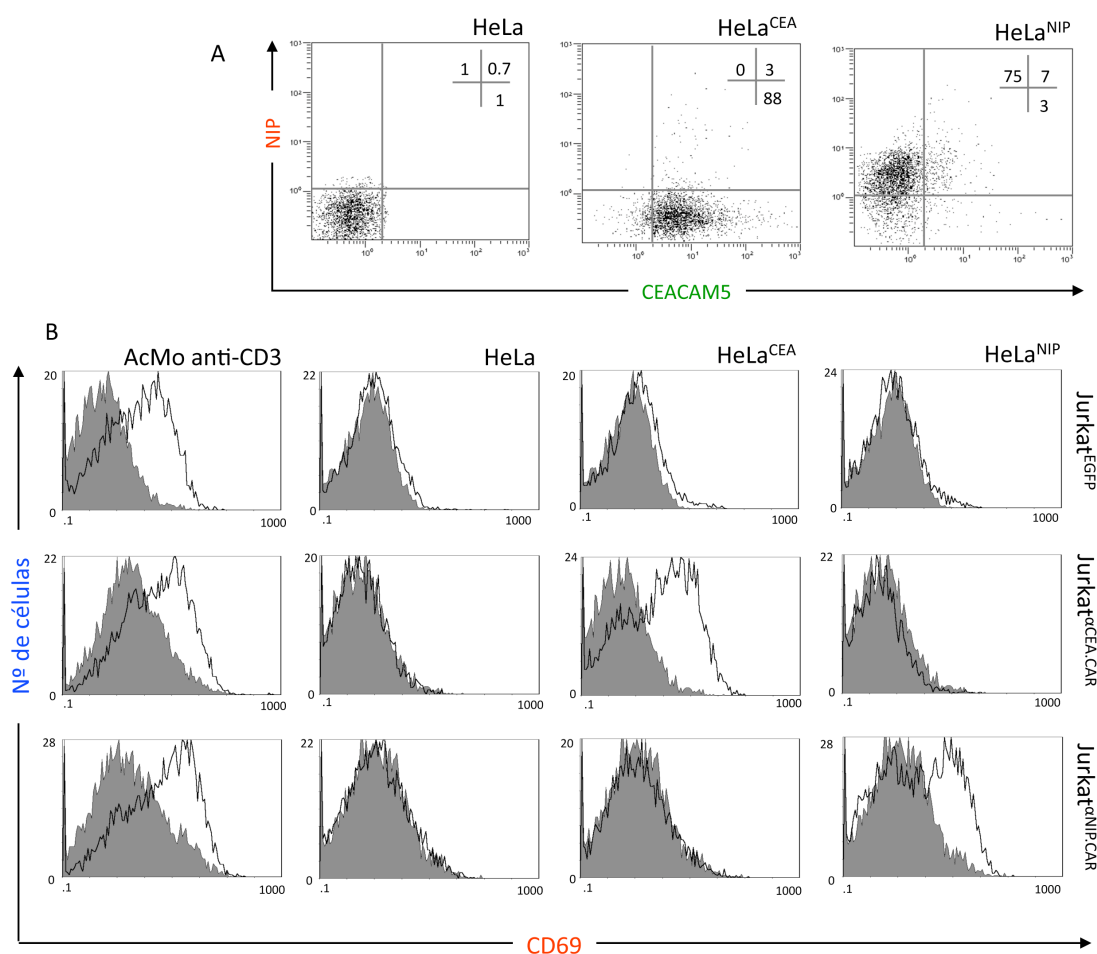


Figura 9: Activación de células T humanas mediada por la ocupación de un CAR. (A) Análisis mediante CF de la expresión en superficie de CEACAM5 (CEA) en células HeLa^{CEA}, y de moléculas NIP en la superficie de células HeLa, marcadas con 2,5 µg/mL del hapteno NIP (HeLa^{NIP}). (B) Análisis mediante CF de la expresión de CD69 (IFD) en células Jurkat^{EGFP}, Jurkat^{αCEA.CAR} y Jurkat^{αNIP.CAR} estimuladas con el AcMo anti-CD3 inmovilizado en placa o con células HeLa, HeLa^{CEA} o HeLa^{NIP} (E:D = 1:1).

1.2. EXPRESIÓN DE MARCADORES TEMPRANOS DE ACTIVACIÓN MEDIADA POR LA OCUPACIÓN DEL CAR

La expresión de CEA en la superficie de las células HeLa^{CEA} así como la presencia de NIP en la superficie de las células modificadas HeLa^{NIP} se comprobó de manera

previa a la realización de un ensayo de activación a pequeña escala utilizando éstas células como diana (Figura 9A).

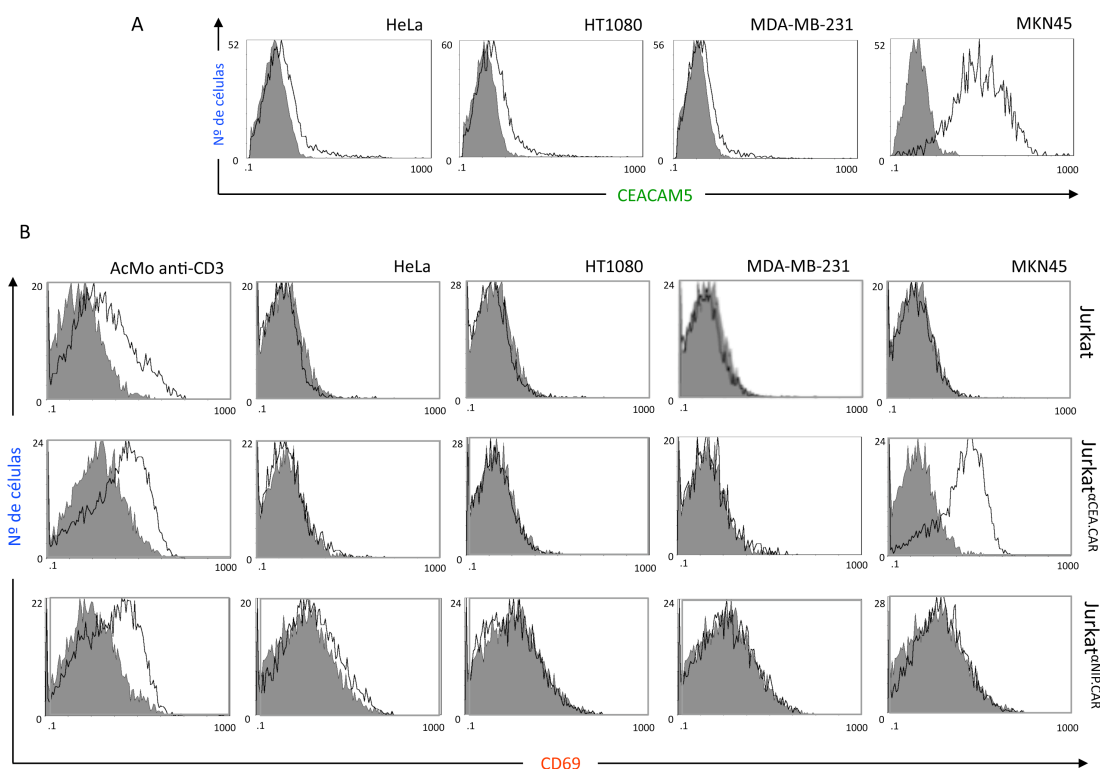


Figura 10: Activación de células T humanas mediada por la ocupación de un CAR. (A)

Análisis mediante CF de la expresión en superficie de CEACAM5 (CEA) en células HeLa, HT1080, MDA-MB-231 y MKN45. (B) Análisis mediante CF de la expresión de CD69 (IFD) en células Jurkat, Jurkat^{αCEA.CAR} y Jurkat^{αNIP.CAR} estimuladas con el AcMo anti-CD3 inmovilizado en placa o con células HeLa, HT1080, MDA-MB-231 ó MKN45 (E:D=1:1).

Para comprobar la activación celular mediada por la ocupación del CAR, las células Jurkat CAR⁻ (Jurkat^{EGFP}) y CAR⁺ (Jurkat^{αNIP.CAR} o Jurkat^{αCEA.CAR}) se cultivaron con células HeLa, HeLa^{CEA}, o HeLa^{NIP}. Tras un periodo de incubación de 16 horas, se analizó el nivel de expresión de CD69 mediante citometría de flujo. Las células Jurkat^{αCEA.CAR} expresaron CD69 en presencia de células HeLa^{CEA} y no lo hicieron tras el cocultivo con células HeLa o HeLa^{NIP}. Las células Jurkat^{αNIP.CAR} expresaron CD69 en presencia de células HeLa^{NIP} y no lo hicieron tras el cocultivo con células HeLa o HeLa^{CEA} (Figura 9B). En ambos casos el nivel de expresión de CD69 fue similar al observado en las mismas poblaciones en respuesta a la estimulación con un AcMo anti-

CD3 inmovilizado (Figura 9B). Las células Jurkat^{EGFP}, no expresaron CD69 tras la incubación con HeLa, HeLa^{CEA} o HeLa^{NIP} (Figura 9B).

Para confirmar la especificidad de la activación mediada por el CAR, células Jurkat CAR⁻ (Jurkat parentales) o CAR⁺ (Jurkat^{αNIP.CAR} o Jurkat^{αCEA.CAR}), se cultivaron con distintos tipos de líneas tumorales humanas (Figura 10A). Las células Jurkat^{αCEA.CAR} expresaron CD69 únicamente tras el cocultivo con la línea tumoral CEA⁺ MKN45. Las células Jurkat CAR⁻ y las Jurkat^{αNIP.CAR} no expresaron CD69 tras la incubación con células HeLa, HT1080, MDA-MB-231 o MKN45 (Figura 10B).

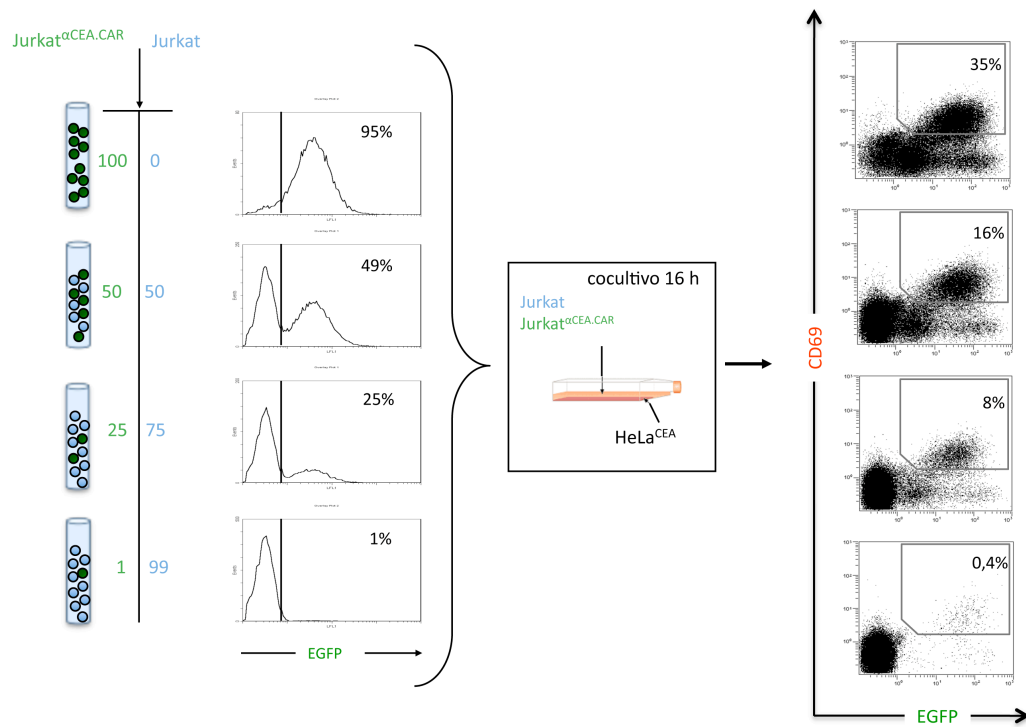


Figura 11: Efecto de una población competidora sobre la activación de las células T mediada por la ocupación de un CAR. Las células efectoras CAR⁺ (Jurkat^{αCEA.CAR}) fueron estimuladas con células diana CEA⁺ (HeLa^{CEA}) durante 16 horas en presencia de células competidoras CAR⁻ (Jurkat), a una relación E:D variable (desde 100:1 hasta 1:100). La proporción de células CAR⁺ y CAR⁻ en las mezclas fue comprobada mediante CF (izquierda). La proporción de células EGFP⁺ activadas (CD69⁺) fue evaluada a las 16 horas del inicio del cocultivo (derecha).

1.3. ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS T QUE EXPRESAN UN CAR CON ESPECIFICIDAD ANTITUMORAL EN PRESENCIA DE POBLACIONES DE CÉLULAS T COMPETIDORAS QUE NO EXPRESAN CAR (CAR⁻)

En un “contexto policlonal”, en una población de células T que expresen un repertorio de anticuerpos, la/s célula/s T que exprese/n un CAR antígeno-específico va/n a representar una mínima parte del total celular. Para determinar si células T CAR⁺ constituyen una buena plataforma para la identificación de anticuerpos antígeno-específicos, se realizaron ensayos de activación células T en presencia de células competidoras CAR⁻. Para ello células Jurkat^{αCEA.CAR} se cocultivaron sobre monocapas de células HeLa^{CEA} en presencia de cantidades crecientes de células Jurkat competidoras CAR⁻ (100:1 a 1:100) y la expresión de CD69 se evaluó mediante citometría de flujo (Figura 11). Nuestros resultados demostraron que la presencia de células T competidoras CAR⁻, no afectó a la activación específica mediada por la ocupación de un CAR con especificidad antitumoral. En todas las situaciones estudiadas, el porcentaje de células EGFP⁺ que expresaron CD69 fue cercano al 40% (Figura 11).

1.4. SELECCIÓN DE CÉLULAS T QUE EXPRESAN UN CAR CON ESPECIFICIDAD ANTITUMORAL A PARTIR DE MEZCLAS CON CÉLULAS T COMPETIDORES (CAR⁻ O CÉLULAS T QUE EXPRESAN UN CAR NO TUMOR-ESPECÍFICO)

Para determinar si células T CAR⁺ constituyen una buena plataforma para la selección de anticuerpos recombinantes antígeno-específicos, se realizaron ensayos de activación-selección de células T en presencia de células competidoras. Para ello, células Jurkat^{αCEA.CAR} se mezclaron proporción 1:1000 con células competidoras Jurkat CAR⁻ (Figura 12), o con células competidoras CAR⁺ (Jurkat^{αNIP.CAR}) (Figura 13) y se cultivaron sobre monocapa de células HeLa^{CEA}. Tras un periodo de incubación de 16 horas, las células T se recuperaron y se marcaron con un AcMo anti-CD69 conjugado con PE, para proceder al aislamiento de células EGFP⁺CD69⁺, mediante citometría separadora. Las células aisladas, Jurkat^{αCEA.CAR/IS} se expandieron *in vitro* y el porcentaje de células EGFP⁺

se evaluó mediante citometría de flujo (Figuras 12 y 13), observándose un incremento de más de 100 veces en el porcentaje de células EGFP⁺, independientemente del tipo de célula Jurkat competidora CAR⁻ (Figura 12) o CAR⁺ (Figura 13). Tras su expansión *in vitro*, la población Jurkat^{αCEA.CAR/1S} se sometió a una nueva ronda de activación-selección, obteniendo un porcentaje de células EGFP⁺ (Jurkat^{αCEA.CAR/2S}) cercano al 100% (Figuras 12 y 13). Por tanto, la activación mediada por la ocupación de un CAR, seguida del aislamiento mediante citometría separadora de las células CD69⁺, resultó en un incremento de más de 1000 veces en el porcentaje de células EGFP⁺ tras dos rondas de activación-selección.

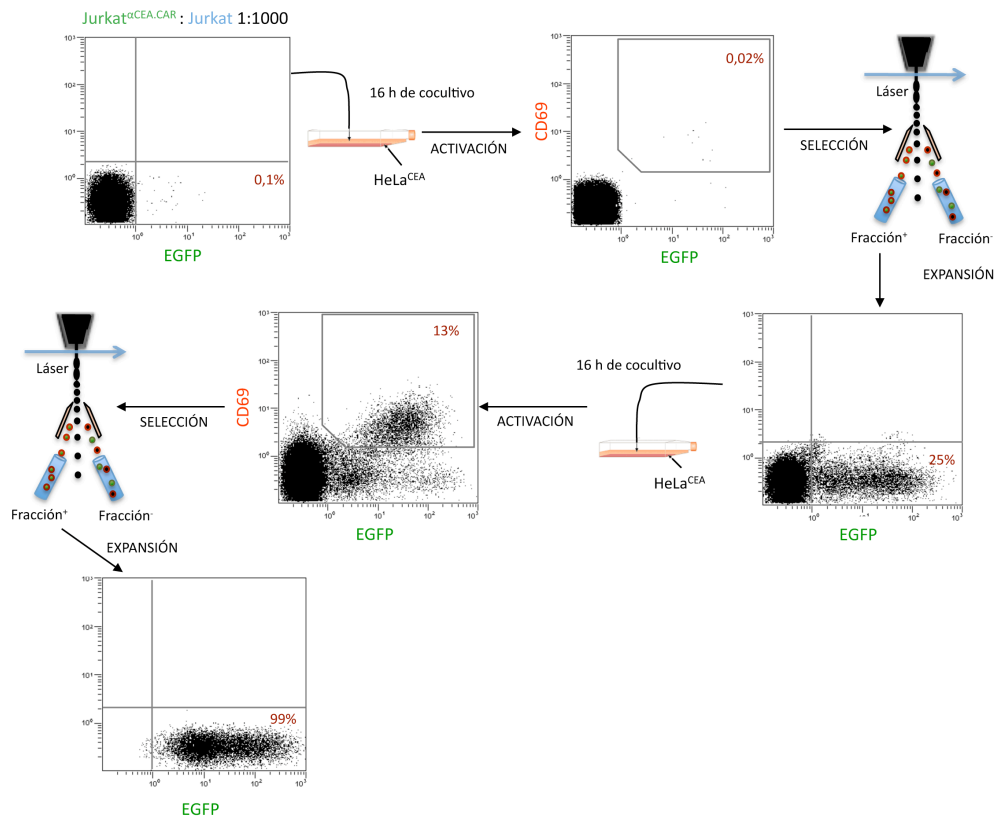


Figura 12: Selección de células T activadas a través de la ocupación de un CAR. Mezclas de células CAR⁺ (Jurkat^{αCEA.CAR}) y de células CAR⁻ (Jurkat) fueron estimuladas con células diana HeLa^{CEA} a una relación E:D de 1:1000, durante 16 horas. Tras el cocultivo, las células T se recuperaron, se marcaron con el AcMo anti-CD69 conjugado con PE y se asilaron por citometría separadora en base a la coexpresión de CD69 y EGFP. Tras un periodo de expansión de las células seleccionadas, se repitió un segundo ciclo de activación/selección.

1.4.1 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y FENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN SELECCIONADA

Los niveles de expresión de EGFP y CAR de la población obtenida tras la segunda ronda de selección Jurkat^{αCEA.CAR/2S} se determinaron mediante citometría de flujo. En ambos casos la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés *Mean Fluorescent Intensity*) se incrementó notablemente, respecto a la población inicial Jurkat^{αCEA.CAR} (Figura 14A). Para determinar la capacidad de activación mediada por la ocupación del CAR, se realizaron ensayos de activación con células HeLa o HeLa^{CEA}.

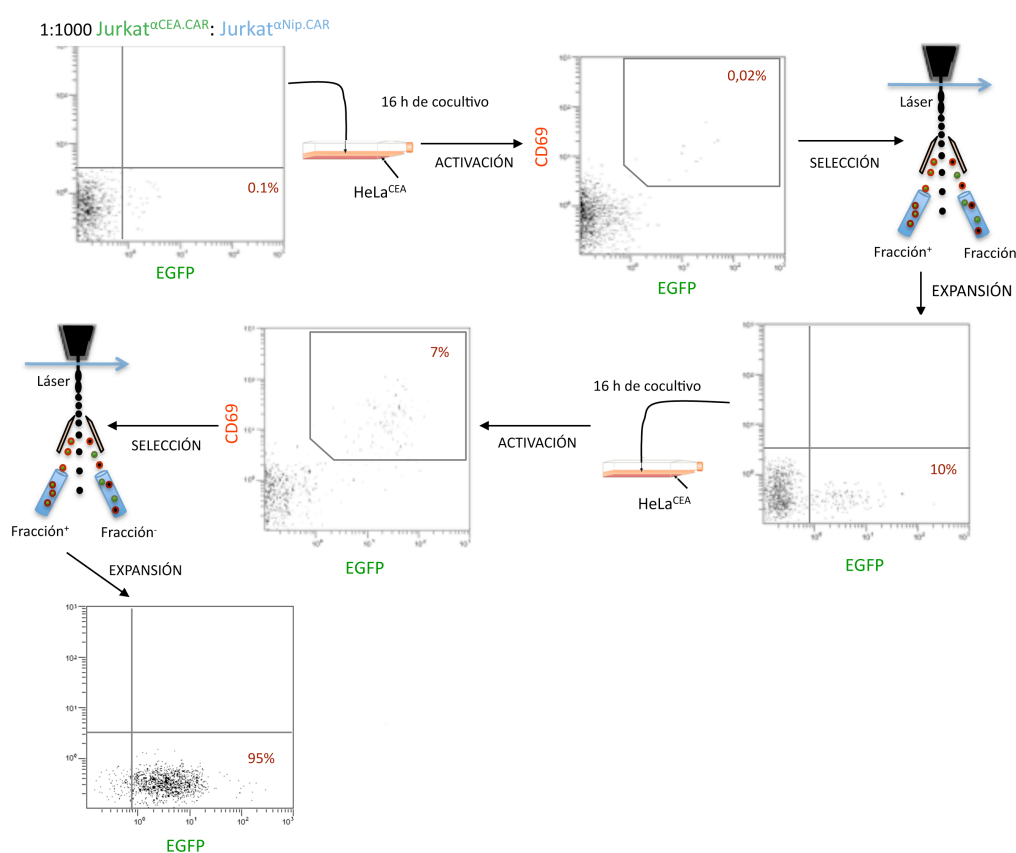


Figura 13: Selección de células T activadas a través de la ocupación de un CAR. Mezclas de células CAR⁺ (Jurkat^{αCEA.CAR} y Jurkat^{αNIP.CAR}) fueron estimuladas con células diana HeLa^{CEA} a una relación E:D de 1:1000, durante 16 horas. Tras el cocultivo, las células T se recuperaron, se marcaron con el AcMo anti-CD69 conjugado con PE y se asilaron por citometría separadora en base a la coexpresión de CD69 y EGFP. Tras un periodo de expansión de las células seleccionadas, se repitió un segundo ciclo de activación/selección.

Como se observa en la Figura 14B las células Jurkat^{αCEA.CAR/2S} se activaron de forma específica y expresaron niveles de CD69 similares a los observados en población inicial

Jurkat^{αCEA.CAR} cultivado en las mismas condiciones. Estos niveles fueron similares a los observados tras la estimulación con un AcMo anti-CD3 inmovilizado.

1.4.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA POBLACIÓN SELECCIONADA

El análisis de 20 clones individuales obtenidos a partir de una preparación de ARN de la población Jurkat^{αCEA.CAR/2S} reveló la ausencia de cambios en la secuencia del CAR, con respecto a la población CAR⁺ original (Jurkat^{αCEA.CAR}), con la excepción de mutaciones de un solo nucleótido, debidas al proceso de amplificación por PCR utilizado en el proceso de caracterización molecular.

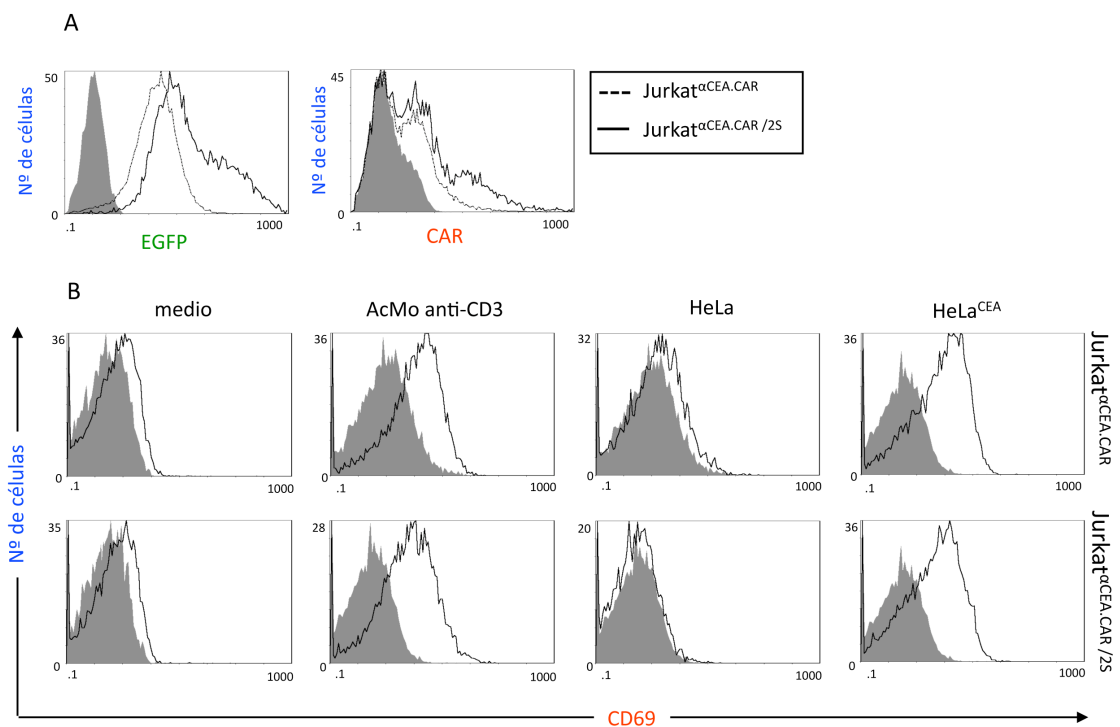


Figura 14: Caracterización fenotípica y funcional de las células CAR⁺ seleccionadas. (A) Análisis comparativo de los niveles de expresión de EGFP y CAR en la población inicial Jurkat^{αCEA.CAR} y en la población obtenida (Jurkat^{αCEA.CAR/2S}) tras dos rondas de activación/selección sobre células HeLa^{CEA}. (B) Análisis comparativo de la expresión de CD69 en células Jurkat^{αCEA.CAR} y Jurkat^{αCEA.CAR/2S} tras la estimulación con el AcMo anti-CD3 inmovilizado en placa o con células diana (HeLa o HeLa^{CEA}) a una relación E:D = 1:1.

2. SELECCIÓN *IN VITRO* DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES HUMANOS MEDIANTE LA PLATAFORMA

DE SELECCIÓN DE ANTICUERPOS EN LINFOCITOS T (PLATAFORMA SALT)

Para valorar el potencial de la plataforma SALT, se procedió al clonaje de distintos repertorios de anticuerpos recombinantes en vectores lentivirales, con el fin de generar poblaciones de células T CAR⁺ “policlonales” y realizar estudios de activación-selección *in vitro* frente a células tumorales. Los repertorios se clonaron en un vector lentiviral que codifica un CAR como el descrito en el apartado 1 de este trabajo, con la porción transmembrana y citoplásmica de la cadena ζ del complejo TCR/CD3 como único segmento de transducción de la señal. Este tipo de CARs, denominados de “primera generación”, pueden inducir fenómenos de muerte programada, en situaciones de estimulación continuada o alta ocupación del CAR (Alvarez-Vallina & Russell, 1999). Este fenómeno de muerte celular inducida por activación (AICD, del inglés *Activation Induced Cell Death*), podría posibilitar la eliminación de “clones autorreactivos”, que reconozcan epítomos expresados en la superficie de las células T presentadoras del repertorio.

2.1 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES QUE CODIFICAN REPERTORIOS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES HUMANOS EN FORMATO CAR (GENOTECAS SALT)

2.1.1. REPERTORIO GRIFFIN.1

La genoteca sintética de anticuerpos recombinantes humanos en formato scFv Griffin.1 se amplificó mediante PCR y se clonó en un sistema de T-A *cloning* (pCR2.1 TOPO), para proceder después al subclonaje en el vector lentiviral pRRL.^{FLAG} α NIP.TCR ζ .IRES.EGFP (Figura 15) sustituyendo la región codificante del scFv anti-NIP (B1.8) por el repertorio de scFvs de la genoteca Griffin.1. Se obtuvo así la genoteca lentiviral pRRL.^{FLAG}Griffin.TCR ζ .IRES.EGFP (**Genoteca SALT^{Griffin}**), con una diversidad teórica calculada en $1,5 \times 10^5$ clones. Para la producción de partículas virales, la línea celular 293T se cotransfectó de forma transitoria con el vector lentiviral generado y con tres plásmidos de empaquetamiento que aportan, en *trans*, las proteínas estructurales y replicativas necesarias para la producción de partículas lentivirales (LV^{Griffin.CAR-EGFP}). Tras 48 horas el medio de cultivo se recogió, se filtró y se procedió a

la titulación de las PF y a la titulación biológica. Con ambos procedimientos se obtuvo un título de $1 \times 10^7/\text{ml}$.

2.1.2. REPERTORIO TOMLINSON

La genoteca sintética de anticuerpos recombinantes humanos en formato scFv Tomlinson I+J se amplificó mediante PCR y se clonó en el vector pRRL.^{FLAG} α NIP.TCR ζ .IRES.EGFP (**Genoteca SALT^{Tomlinson}**), sustituyendo la región codificante del scFv anti-NIP (B1.8) por el repertorio de scFvs de la genoteca Tomlinson I+J (Figura 15). Se obtuvo así la genoteca lentiviral pRRL.^{FLAG}Tomlinson.TCR ζ .IRES.EGFP, con una diversidad teórica calculada en 1×10^5 clones distintos. Debido a que la diversidad del repertorio Tomlinson I+J fue menor que la del repertorio Griffin 1., se decidió utilizar éste último para la generación de poblaciones que expresasen el repertorio de anticuerpos en formato CAR.

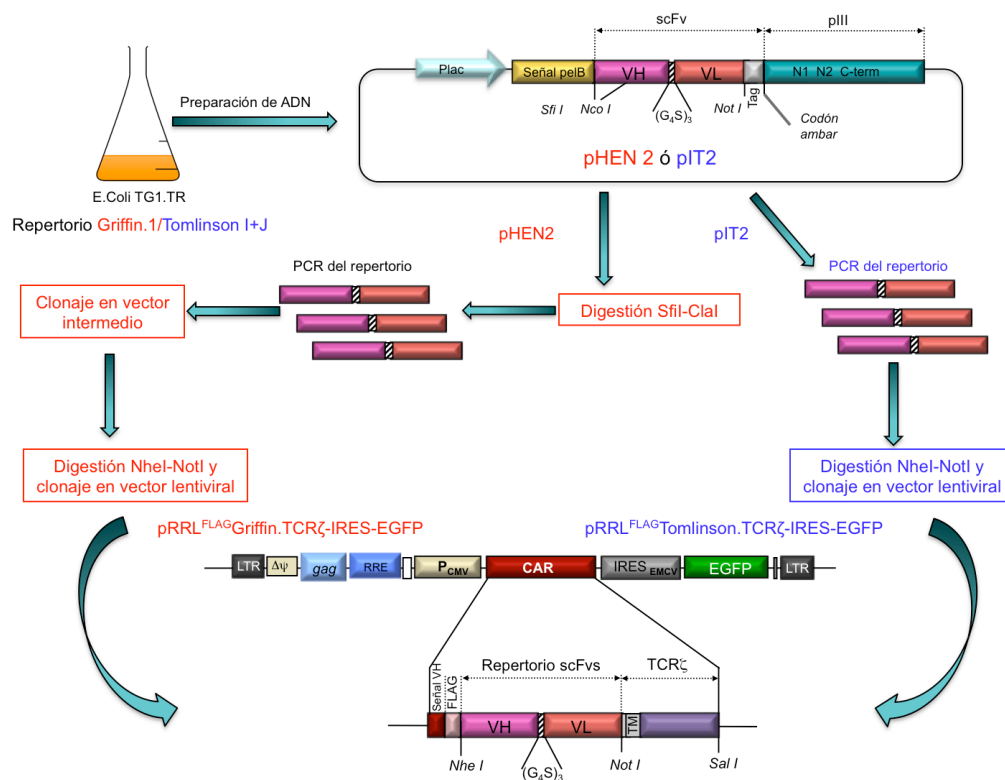


Figura 15: Representación esquemática del proceso de clonado de un repertorio de Acs humanos en un vector lentiviral. Las secuencias codificantes de los scFv se amplificaron mediante PCR partir de preparaciones de ADN de la genoteca sintéticas Griffin.1 o Tomlinson I+J, y se clonaron en el vector lentiviral pRRL.^{FLAG} α NIP.TCR ζ .IRES.EGFP para generar los vectores pRRL.^{FLAG}Griffin.TCR ζ .IRES.EGFP y pRRL.^{FLAG}Tomlinson.TCR ζ .IRES.EGFP, respectivamente.

2.2 TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS T HUMANAS PARA LA EXPRESIÓN DEL REPERTORIO DE ANTICUERPOS EN FORMATO CAR

Células Jurkat se infectaron con el genoteca $LV^{Griffin.CAR-EGFP}$ a una MDI de 1. La expresión de EGFP y del CAR en las población resultante ($Jurkat^{Griffin.CAR}$) se evaluó mediante citometría de flujo (Figura 16). El porcentaje de células $EGFP^+CAR^+$ fue del 3%. Por tanto, la eficiencia de transducción de las células T con el lentivirus “policlonal” $LV^{Griffin.CAR-EGFP}$ es menor que con los lentivirus “monoclonales” $LV^{\alpha CEA.CAR-EGFP}$ y LV^{EGFP} . Teniendo en cuenta que se infectaron de 2×10^7 células Jurkat y que la diversidad total del repertorio era de $1,5 \times 10^5$, se consideró que el repertorio de Acs humanos derivado de la genoteca Griffin.1 en formato CAR, estaba enteramente representado en la población celular obtenida ($Jurkat^{Griffin.CAR}$), incluso considerando un porcentaje de células CAR^+ tan bajo. Por tanto, la población $Jurkat^{Griffin.CAR}$ se expandió para proceder a realizar ensayos de activación-selección con líneas tumorales humanas.

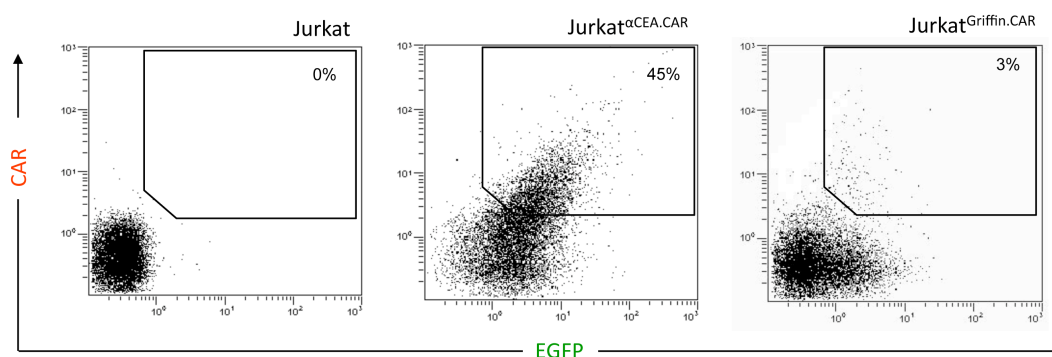


Figura 16: Caracterización fenotípica de la población $Jurkat^{Griffin.CAR}$. Análisis de la expresión de EGFP y CAR (IFI) mediante CF tras la transducción de células Jurkat con el $LV^{Griffin.CAR-EGFP}$ a una MDI de 1.

2.2.1. ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T QUE EXPRESAN CARs DERIVADOS DEL REPERTORIO GRIFFIN. 1

Con el objetivo de evaluar la reactividad de la población “policlonal” $Jurkat^{Griffin.CAR}$, se realizó una incubación a pequeña escala con células tumorales humanas HeLa y HeLa^{CEA}, a un relación efector:diana de 1:1. Como controles se utilizaron una población

CAR⁻ Jurkat^{EGFP} y la población CAR⁺ “monoclonal” Jurkat^{αCEA.CAR}. Tras 16 horas las células T se marcaron con un AcMo anti-CD69 conjugado con PE (Figura 17).

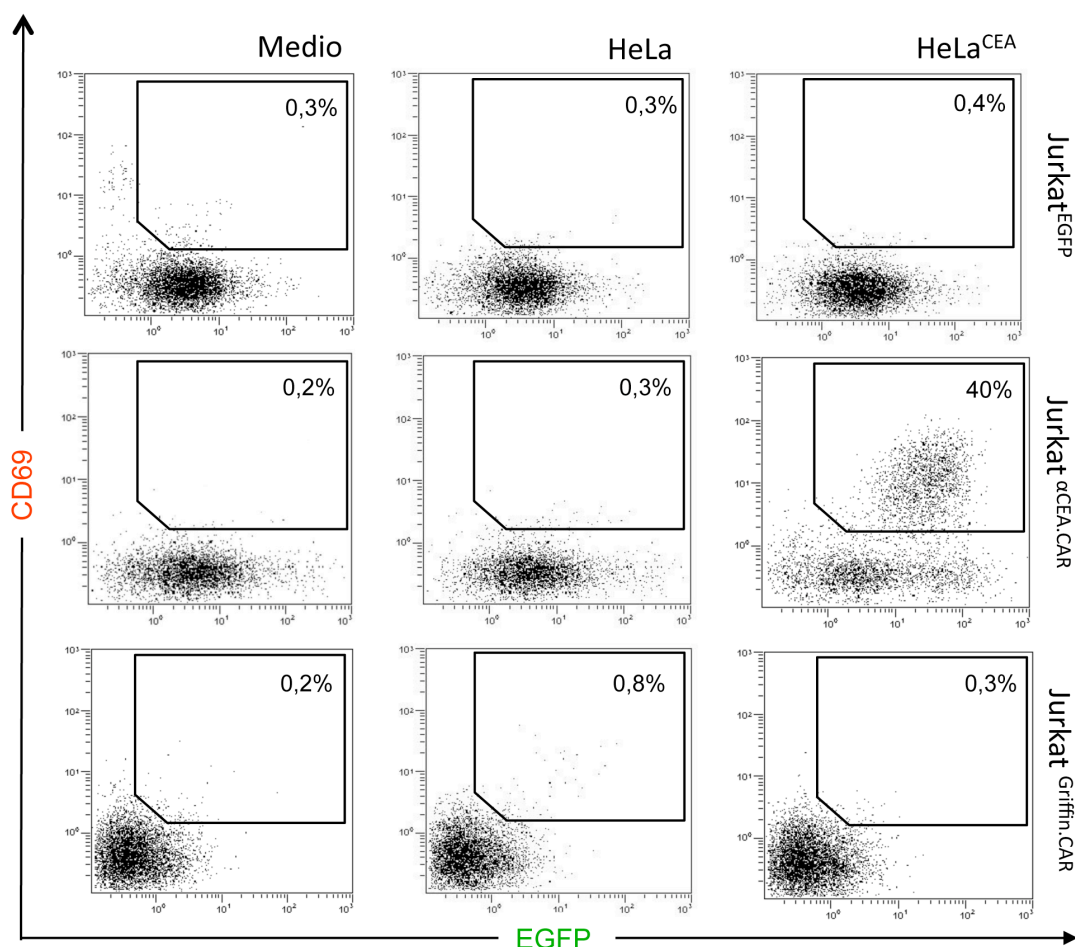


Figura 17: Caracterización funcional de la población Jurkat^{Griffin.CAR}. Análisis mediante CF de la expresión de CD69 (IFD) por células Jurkat , Jurkat^{αCEA.CAR} y Jurkat^{Griffin.CAR} estimuladas en presencia de células diana (HeLa o HeLa^{CEA}) a una relación E:D = 1:1.

Como se observa en la Figura 17, en ambos casos el porcentaje de células Jurkat^{Griffin.CAR} que expresaron niveles apreciables de CD69⁺ fue bajo. Sin embargo, el porcentaje de células Jurkat^{Griffin.CAR} activadas fue superior en los ensayos con células HeLa que en los ensayos de activación con células HeLa^{CEA} (Figura 17). Por este motivo se eligieron las células HeLa como población diana para el proceso de activación-selección *in vitro*. La población “monoclonal” Jurkat^{αCEA.CAR}, se activó específicamente en presencia de células HeLa^{CEA}, mientras que las células CAR⁻ Jurkat^{EGFP}, no expresaron CD69 tras la incubación con HeLa o HeLa^{CEA} (Figura 17).

2.3. SELECCIÓN *IN VITRO* DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES HUMANOS FRENTE A ANTÍGENOS EXPRESADOS EN LA SUPERFICIE TUMORAL MEDIANTE LA PLATAFORMA *SALT*

Para la selección *in vitro* de anticuerpos con especificidad frente a antígenos de superficie de las células HeLa, se realizaron ensayos de activación-selección de la población de células T CAR⁺ “policlonal” (Jurkat^{Griffin.CAR}) sobre una monocapa de células HeLa. Tras 16 horas de cocultivo, las células T se recuperaron y se marcaron con un anti-AcMo CD69 conjugado con PE, para proceder al aislamiento mediante citometría separadora de células EGFP⁺CD69⁺.

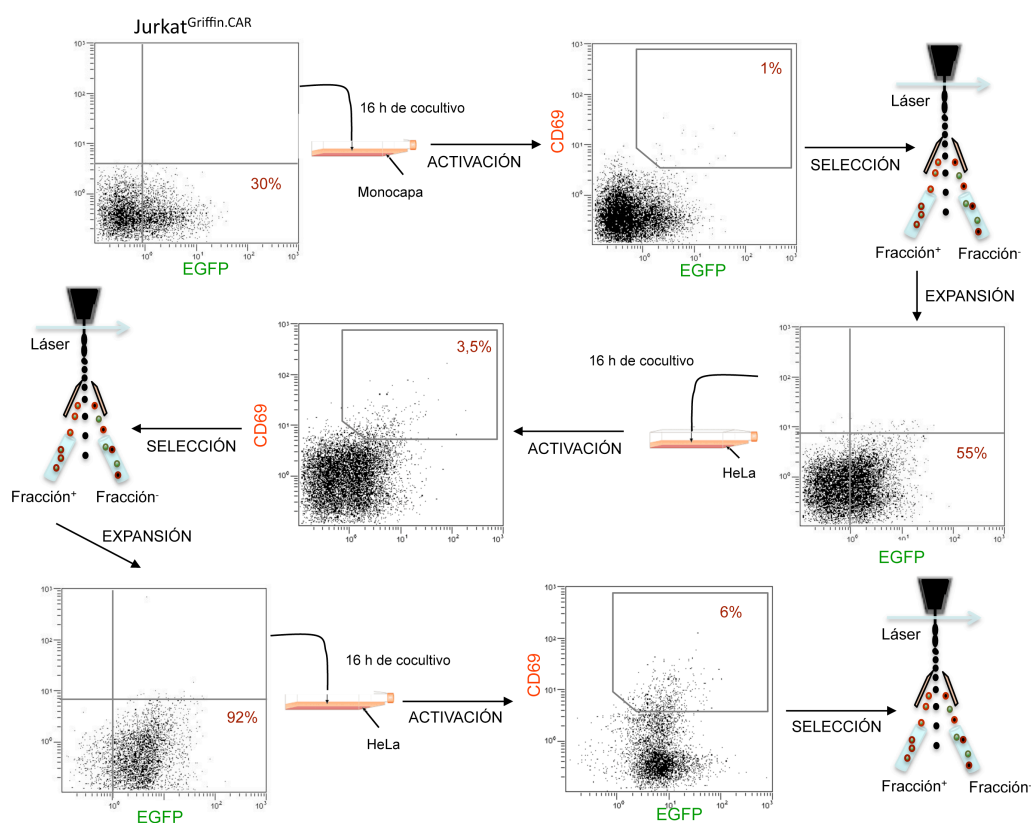


Figura 18: Selección de células T a partir de la población Jurkat^{Griffin.CAR}. La población Jurkat^{Griffin.CAR} se estimuló con células diana HeLa. Tras el cocultivo, las células T se recuperaron, se marcaron con el AcMo anti-CD69 y se aislaron mediante citometría separadora en base a la coexpresión de CD69 y EGFP. Tras un periodo de expansión de las células seleccionadas, se repitieron dos ciclos adicionales de activación/selección.

Tras la primera ronda de activación-selección se obtuvo un 1% de células doble positivas (Figura 18). Tras el aislamiento mediante citometría separadora y expansión *in*

vitro, se evidenció que un 55% de las células expresaban niveles intermedios/bajos de EGFP (Figura 18). A partir de esta población ($\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR/1S}}$) se procedió a realizar una segunda ronda de activación-selección en las mismas condiciones, tras la que se observó un 3,5% de las células $\text{EGFP}^+\text{CD69}^+$. Tras su aislamiento y expansión, el porcentaje de células EGFP^+ en la población resultante fue superior al 90% (Figura 18). Esta población ($\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR/2S}}$), se sometió a una tercera ronda de activación-selección sobre una monocapa de células HeLa, obteniéndose un 6% de células $\text{EGFP}^+\text{CD69}^+$. Tras su aislamiento y expansión ($\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR/3S}}$), el porcentaje de células EGFP^+ fue del 100% (Figura 18).

2.3.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL

Las población original ($\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR}}$) y las poblaciones obtenidas ($\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR/1S}}$, $\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR/2S}}$ y $\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR/3S}}$) se analizaron mediante CF para estudiar los niveles de expresión de EGFP y CAR. Como se observa en la Figura 19, la expresión de la EGFP, aumentó tras cada ronda de activación-selección, mientras que la expresión del CAR no varió significativamente. Sin embargo, en ensayos de activación mediante cocultivo a pequeña escala de células HeLa con la población original ($\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR}}$) y con las poblaciones obtenidas ($\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR/1S}}$, $\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR/2S}}$ y $\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR/3S}}$), se observó que el nivel de expresión de CD69 aumentaba notablemente en las poblaciones obtenidas tras la segunda y tercera ronda de activación-selección (Figura 20).

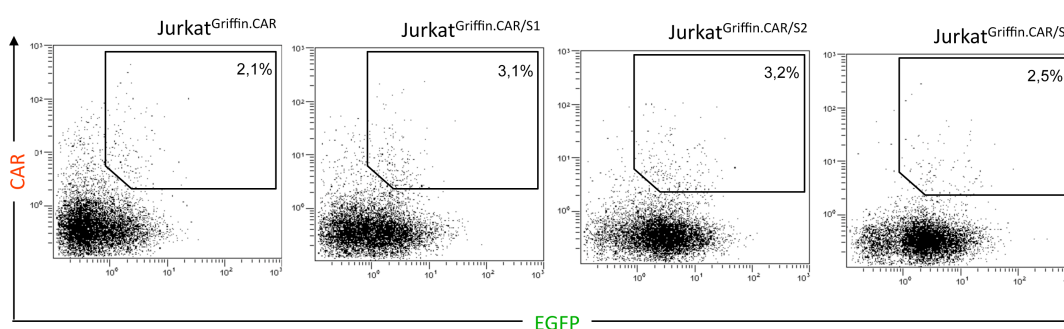


Figura 19: Caracterización fenotípica de las poblaciones $\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR}}$ obtenidas tras las distintas rondas de selección/activación. Análisis comparativo de la expresión de EGFP y CAR en la población inicial ($\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR}}$) y las poblaciones seleccionadas tras una ($\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR/S1}}$), dos ($\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR/S2}}$) o tres ($\text{Jurkat}^{\text{Griffin.CAR/S3}}$) rondas de activación/selección sobre células HeLa.

Para evaluar la reactividad de las poblaciones obtenidas tras cada ronda de activación-selección frente a otras líneas tumorales humanas se realizaron ensayos de cocultivo a pequeña escala con células de HT1080 (fibrosarcoma), y células MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamario). El análisis por CF indica cierto grado de activación tanto en la población original (Jurkat^{Griffin.CAR}) como en las poblaciones obtenidas tras cada ronda de activación-selección (Jurkat^{Griffin.CAR/1S}, Jurkat^{Griffin.CAR/2S} y Jurkat^{Griffin.CAR/3S}), en los cocultivos con HT1080 y MDA MB-231, aunque los niveles de expresión de CD69 eran inferiores a los observados en los cocultivos de las mismas poblaciones con células HeLa (Figura 21B). La población control Jurkat CAR⁻ no se activó frente a ninguna línea tumoral, y la población CAR⁺ monoclonal Jurkat^{αCEA.CAR} se activó específicamente tras la incubación con células HeLa^{CEA} (Figura 21A).

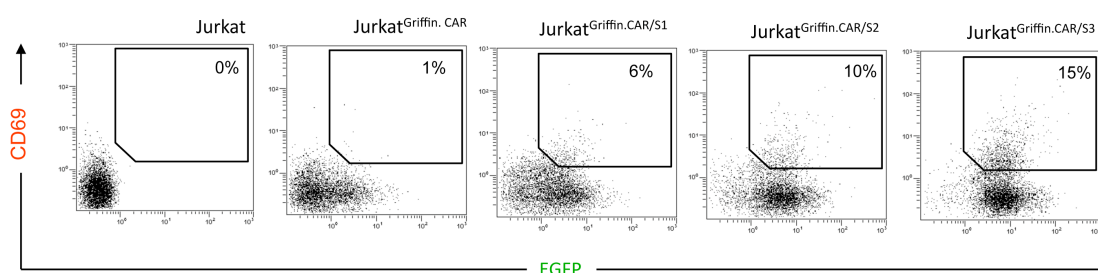


Figura 20: Caracterización funcional de las poblaciones Jurkat^{Griffin.CAR} obtenidas tras las distintas rondas de selección/activación Análisis por CF de la expresión de CD69 por células Jurkat, Jurkat^{Griffin.CAR}, Jurkat^{Griffin.CAR/S1}, Jurkat^{Griffin.CAR/S2} y Jurkat^{Griffin.CAR/S3} estimuladas en presencia de células diana (HeLa) a una relación E:D = 1:1.

2.3.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS POBLACIONES SELECCIONADAS

2.3.2.1. ESTUDIO DE DIVERSIDAD CLONAL

El ARN total de la población original (Jurkat^{Griffin.CAR}) así como de las poblaciones obtenidas tras cada ronda de activación-selección (Jurkat^{Griffin.CAR/1S}, Jurkat^{Griffin.CAR/2S} y Jurkat^{Griffin.CAR/3S}), fue purificado para proceder a la obtención del ADNc mediante retrotranscripción. La secuencia de los scFvs fue amplificada mediante PCR y clonada por el sistema T-A *cloning* en el vector pCR2.1 TOPO.

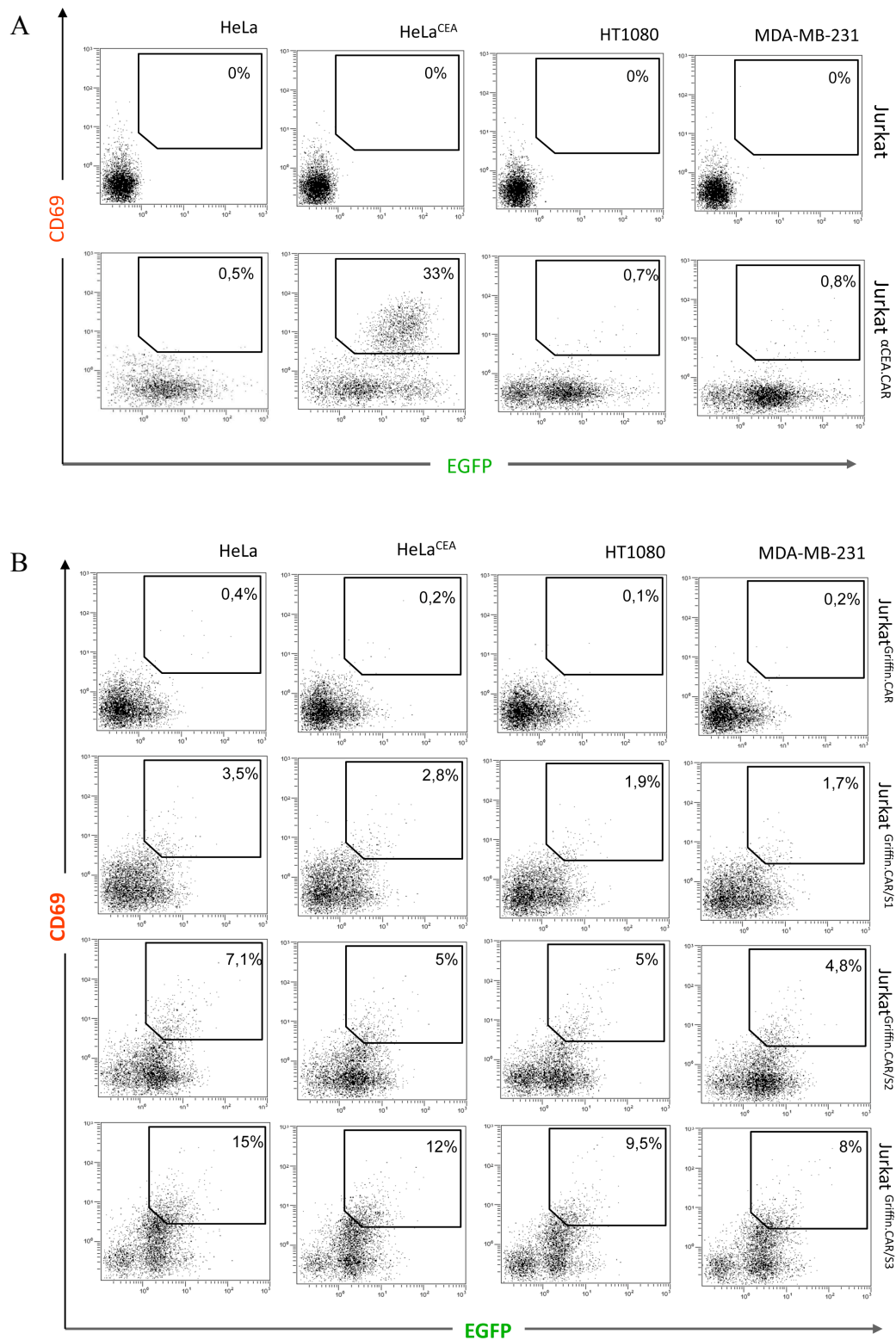


Figura 21: Caracterización funcional de las poblaciones Jurkat^{Griffin.CAR} obtenidas tras las distintas rondas de selección/activación (A) Análisis por CF de la expresión de CD69 por células Jurkat y Jurkat ^{α CEA.CAR} estimuladas en presencia de células diana (HeLa, HeLa^{CEA}, HT1080 ó MDA-MB-231) a una relación E:D = 1:1. (B) Análisis por CF de la expresión de CD69 por células Jurkat^{Griffin.CAR}, Jurkat^{Griffin.CAR/S1}, Jurkat^{Griffin.CAR/S2} y Jurkat^{Griffin.CAR/S3} estimuladas en presencia de células diana (HeLa, HeLa^{CEA}, HT1080 ó MDA-MB-231) a una relación E:D = 1:1

En cada población se seleccionó aleatoriamente una muestra de 200 clones y se realizó un estudio de la diversidad clonal. En primer lugar en 51 clones se realizó un estudio de huella de ADN (*fingerprinting*), mediante PCR y digestión con la enzima de restricción de corte frecuente BstNI (Figura 22). De los 51 clones seleccionados de cada población, un 5% resultaron ser clones vacíos (scFv). De los clones scFv⁺ aproximadamente un 30-40% de los clones presentaban el mismo patrón de huella de ADN (Figura 22). El análisis mediante secuenciación reveló que el clon repetido era el scFv B1.8, procedente del vector pRRL.^{FLAG}αNIP.TCRζ.IRES-EGFP utilizado para el clonaje del repertorio Griffin.1. Esta proporción del clon contaminante, se mantuvo constante a lo largo del proceso de selección, ya se estimó durante el clonaje del repertorio Griffin.1, mediante el recuento del número de colonias obtenido tras la reacción de ligado del vector pRRL.^{FLAG}αNIP.TCRζ.IRES-EGFP, en ausencia de inserto.

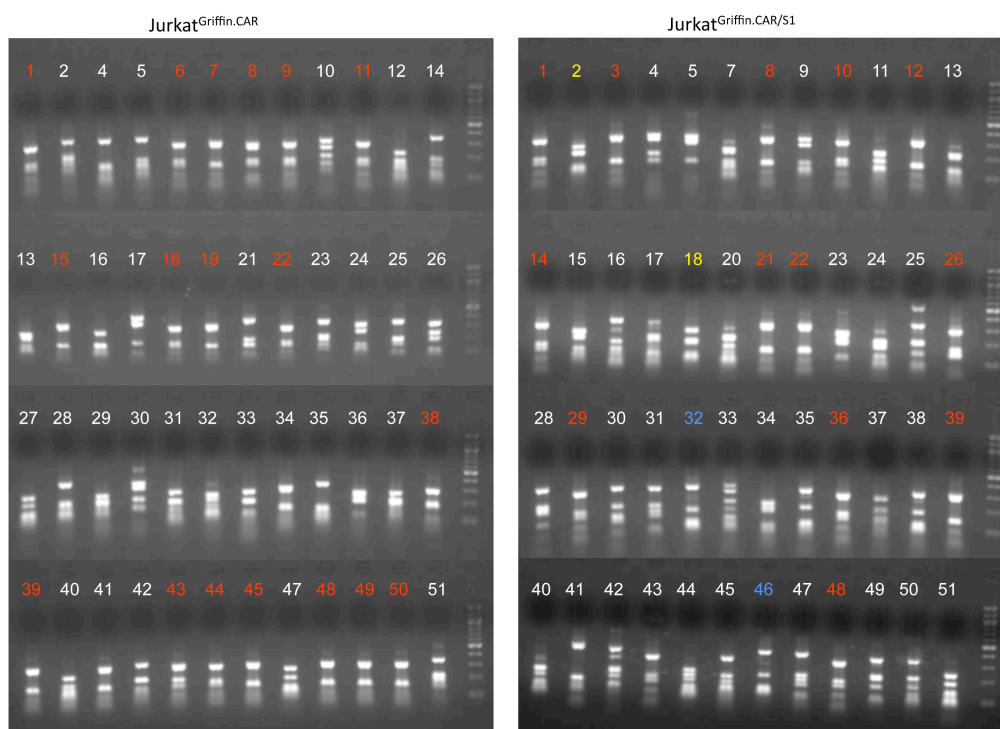


Figura 22: Estudio de la diversidad clonal mediante la huella de ADN (*fingerprinting*).

Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa del producto de la digestión con la enzima BstNI de las reacciones de PCRs realizadas a partir de los clones seleccionados de las poblaciones Jurkat^{Griffin.CAR} y Jurkat^{Griffin.CAR/S1}. El 30-40% de los clones presentaban el mismo patrón de *fingerprinting* (números marcados en rojo), tanto en la población Jurkat^{Griffin.CAR} como en la población Jurkat^{Griffin.CAR/S1}. El análisis mediante secuenciación reveló que el clon repetido era B1.8. En la población Jurkat^{Griffin.CAR/S1}, se observaron clones repetidos (marcados en amarillo y azul), consecuencia del proceso de enriquecimiento debido a la activación/selección.

Se consideró que los CAR contaminantes anti-NIP no afectaban al proceso de selección, ya que su proporción se mantuvo constante a lo largo del proceso de selección. El estudio de huella de ADN reveló que en la población original (Jurkat^{Griffin.CAR}) no había otros clones repetidos, aparte del clon B1.8 (Figura 22).

Sin embargo, el número de clones repetidos incrementaba significativamente a medida que se aumentaba el número de rondas de activación-selección. Estos datos se confirmaron mediante la secuenciación de ADN. Se secuenciaron 200 clones de cada ronda de selección además de 200 clones de la población original. Los clones seleccionados se agruparon en función de las semejanzas en la secuencia de las regiones V_H y V_L (Anexo I). Se comprobó que en el repertorio naif (preselección) todos los clones eran diferentes. Se observaron algunos clones que compartían genes V_H o V_L, pero cuyas CDRs eran diferentes, con un predominio de la familia V_{H1} y V_{L1} y V_{L2}. En el Anexo I se pueden observar las proporciones de las familias V_H y V_L, siendo destacable la ausencia de representación de ciertas familias, como la V_{H2} o la V_{L5}, V_{L6}, V_{L7}, V_{L8} y V_{L10}. Tras la primera ronda de selección, se observó la presencia de algunos clones repetidos, al menos 1 vez, que no se observaron en el repertorio preselección. Es interesante destacar la presencia de algunos clones con la misma secuencia, que difieren únicamente en la región CDR3 (Anexo I). Tras la tercera ronda de activación-selección, se observa un gran enriquecimiento clonal, y una diversidad del repertorio mucho menor (Anexo I). En todas las rondas de activación-selección se observaron clones idénticos a excepción de la secuencia de la CDR3 (V_H o V_L), lo que podría indicar que algunos clones pueden estar reconociendo distintas zonas de la misma molécula.

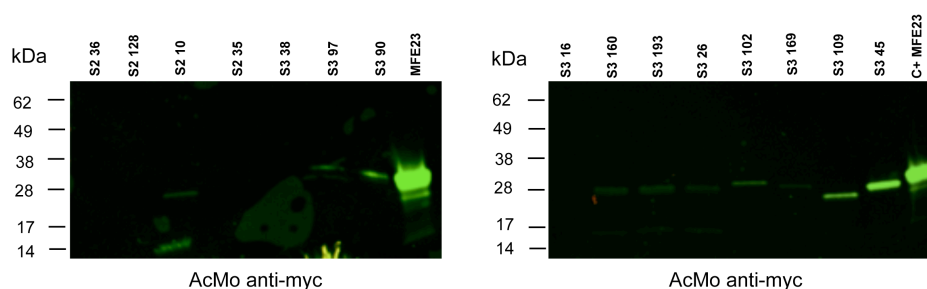
Tabla VI Selección de clones de scFv para expresión en eucariotas	
Ronda de selección	Clones
S1	58, 64, 66, 86, 90, 99, 107, 111, 132
S2	2, 10, 25, 30, 35, 36, 76, 77, 128
S3	16, 26, 38, 45, 90, 97, 102, 109, 160, 169, 193

2.3.2.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS SELECCIONADOS

En base al análisis de secuencias se seleccionaron varios scFvs de cada ronda de selección-activación para realizar un análisis más detallado. Se seleccionaron clones (i)

presentes en más de una ronda de selección, (ii) clones que se encontraban repetidos más de dos veces en la misma ronda de selección y (iii) clones que compartían la misma secuencia a excepción de una de las CDRs (normalmente la CDR3 de la V_L). Los 29 clones elegidos (Tabla VI), no estaban presentes en el repertorio original (preselección). Los 29 scFvs seleccionados (*CARBodies*) se clonaron en el vector de expresión procariota pAB2, en marco con el péptido señal pelB y con las etiquetas peptídicas myc y 6His en el extremo C-terminal. Se transformaron bacterias E. Coli TG1 con los 29 plásmidos y se procedió a la expresión a pequeña escala, de los scFvs en el sobrenadante bacteriano. Los sobrenadantes se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia *Western* en condiciones reductoras. El revelado con el AcMo anti-myc indicaba que el patrón de migración correspondía al tamaño molecular teórico aproximado de un scFv \approx 28 kDa (Figura 23A).

A



B

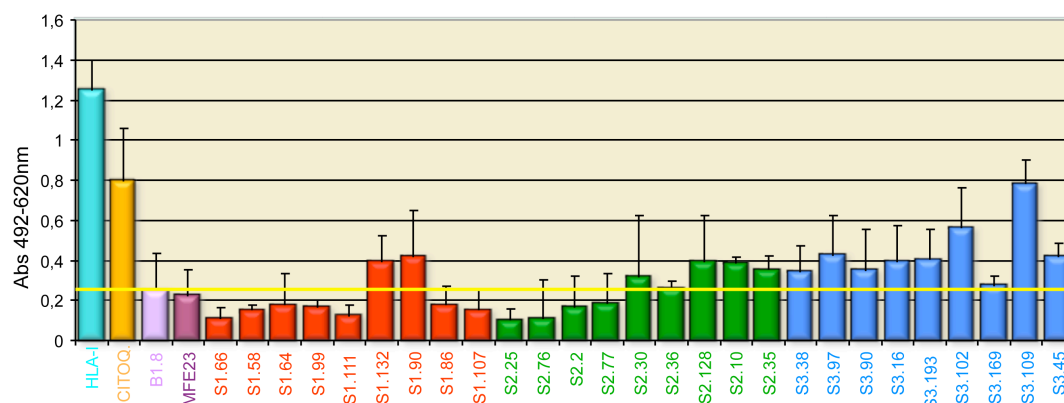


Figura 23: Evaluación de la reactividad de los clones seleccionados a partir de las distintas rondas de activación/selección frente a células HeLa. (A) Análisis mediante transferencia *Western* de los sobrenadante de células HB2151 estimuladas con IPTG. La detección se realizó con un AcMo anti-myc y un Ac de burro anti-IgG de ratón conjugado con IRDye800. (B) La reactividad de los diferentes scFvs (*CARBodies*) seleccionados se determinó mediante ELISA frente a células HeLa fijadas al aire. La detección se realizó utilizando un AcMo anti-c-myc y un Ac de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP.

Con excepción de algunos clones (S3.16, S1.99, S2.35, S2.36, S2.128, S3.16 y S3.38), que se secretaban en cantidades muy limitantes, la mayor parte de los scFvs se detectaron, en concentraciones que oscilaban entre 200 ng/ml y 1,2 µg/ml, calculadas mediante densitometría.

2.3.2.3. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS SELECCIONADOS

Se procedió a expresar de nuevo los 29 *CARbodies*, conservando en este caso las fracciones periplásmica y osmótica, en lugar del sobrenadante de cultivos bacterianos. Para evaluar la especificidad clonal se realizó un ELISA frente a células HeLa fijadas al aire (Figura 23B). De esta manera, se comprobó que al menos 14 de los 29 *CARbodies* analizados reconocían de manera específica las células HeLa, pero lo que era más importante, se comprobó que el número de clones específicos se incrementaba tras cada ronda de selección (Figura 23B). De los 29 *CARbodies* analizados, se seleccionaron los clones S3.45, S3.97 y S3.109 por ser clones dominantes de la tercera ronda de activación-selección que presentaron una señal importante en el ELISA frente a células HeLa, utilizando tanto el sobrenadante de cultivo bacteriano como la mezcla de las fracciones periplásmica y osmótica. Estos *CARbodies* se expresaron a mayor escala (50 ml), y se purificaron a partir de las fracciones periplásmica y osmótica mediante IMAC.

Considerando que los scFvs han sido seleccionados en el contexto de un CAR expresado en la superficie celular T, y que la estrecha interacción (sinapsis) entre la célula T y la célula diana puede favorecer el acceso a epítopos cercanos a la superficie de la membrana celular, y en consecuencia inaccesibles para los anticuerpos solubles, se decidió estudiar la especificidad de los *CARbodies* purificados, mediante el marcaje de células HeLa previamente tratadas con hialuronidasa. La hialuronidasa modifica la permeabilidad del glicocáliz celular de las células epiteliales (Fritsch et al, 1975; Gao & Lipowsky, 2010), mejorando la accesibilidad a las proteínas de membrana. La unión de los scFvs purificados a las células diana (HeLa y HeLa^{CEA}) se evaluó mediante IFI en células, tratadas y no tratadas con Hialuronidasa, con los *CARbodies* purificados, seguido del marcaje con el AcMo anti-c-myc y un un Ac de cabra F(ab')₂ anti-IgG de ratón conjugado con PE.

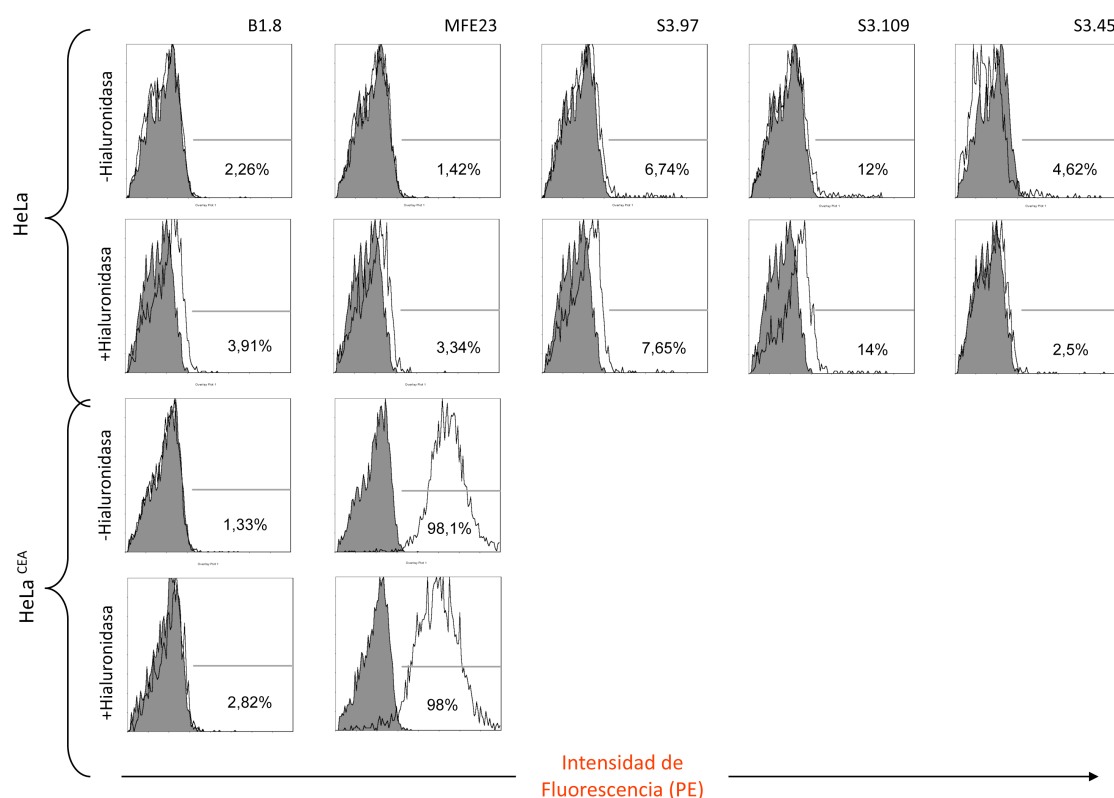


Figura 24: Evaluación de la reactividad de los clones seleccionados frente a células HeLa. La reactividad de los *CARbodies* purificados S3.97, S3.109 y S3.45 frente a las células HeLa, tratadas y no tratadas con Hialuronidasa, se evaluó mediante CF. Como control de marcaje se usaron los scFv purificados B1.8 (anti-NIP) y MFE23 (anti-CEA), frente a células HeLa y HeLa^{CEA} en las mismas condiciones.

El estudio por CF (Figura 24) demostró que el tratamiento con hialuronidasa favorecía la interacción de los Acs con la superficie celular. Igualmente, se observó que el clon S3.109 era el *CARbody* que presentaba valores de MFI más altos, seguido del S3.97. El S3.45 presentó unos valores muy bajos. En los tres casos, se observó que además de producirse un incremento en la MFI, existía un pequeño porcentaje de células que eran reconocidas con alta intensidad. Estos datos sugieren que el/los Ag/s reconocido/s por los *CARbodies* (i) se expresa/n a niveles bajos en células HeLa, y/o (ii) que tiene/n un patrón de expresión heterogénea, y puede/n estar expresándose a niveles más altos en una subpoblación de células HeLa. Por este motivo, no es posible comparar estos perfiles, con los obtenidos con el scFv MFE23 usado como control, ya que se trata de un scFv de alta afinidad, que reconoce un epítipo muy accesible en el CEA, que se expresa a niveles altos y de forma homogénea en células HeLa^{CEA}. En cualquier caso, los

CARBodies seleccionados, pueden ser de utilidad en un protocolos de terapia adoptiva con células T genéticamente modificadas CAR⁺, ya que en ese contexto Ags expresados a niveles bajos pueden inducir una adecuada activación de las células T (Álvarez-Vallina & Russell, 1999; Álvarez-Vallina *et al*, 2000; Turatti *et al*, 2007; Morgan *et al*, 2010).

2.4. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS SELECCIONADOS (*CARBODIES*) EN EL CONTEXTO DE UN CAR MULTISEGMENTO.

2.4.1. OPTIMIZACIÓN DE LOS CAR

Los protocolos actuales de terapia adoptiva con células T genéticamente modificadas para que expresen CARs en la superficie, utilizan construcciones multisegmento (CARs de segunda generación) que incorporan además del segmento intracelular de la cadena ζ del complejo TCR-CD3 dominios derivados de moléculas coestimuladoras, para favorecer la activación y supervivencia celular, evitando o minimizando los fenómenos de AICD (Álvarez-Vallina & Russell, 1999; Álvarez-Vallina *et al*, 2000). Otra modificación consiste en la adición de un dominio espaciador extracelular, que permite alejar el scFv de la superficie celular T, aumentando notablemente el área de influencia del CAR.

2.4.2. CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR LENTIVIRAL QUE CODIFICA UN CAR MULTISEGMENTO (CARv1)

Se diseñó un CAR de segunda generación, que contenía en tándem los siguientes segmentos: como segmento de unión, el scFv anti-CEA MFE23; como segmento espaciador, la región bisagra de la porción extracelular de CD8 α ; como segmento de anclaje a membrana, la porciones transmembrana de CD28; y como segmento de transducción de señales las regiones intracitoplásmicas de CD28 y de TCR ζ (Figura 25). La secuencia de ADN codificante de los dominios espaciador y de transducción de señales (CD8 α .CD28.TCR ζ) fue sintetizada por Geneart AG, y se clonó en el vector pRRL.^{FLAG} α CEA.TCR ζ -IRES-EGFP, para obtener el vector pRRL.^{FLAG} α CEA.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP (Figura 25). Las partículas lentivirales (LV ^{α CEA.CARv1-EGFP}) se obtuvieron y titularon siguiendo los protocolos habituales.

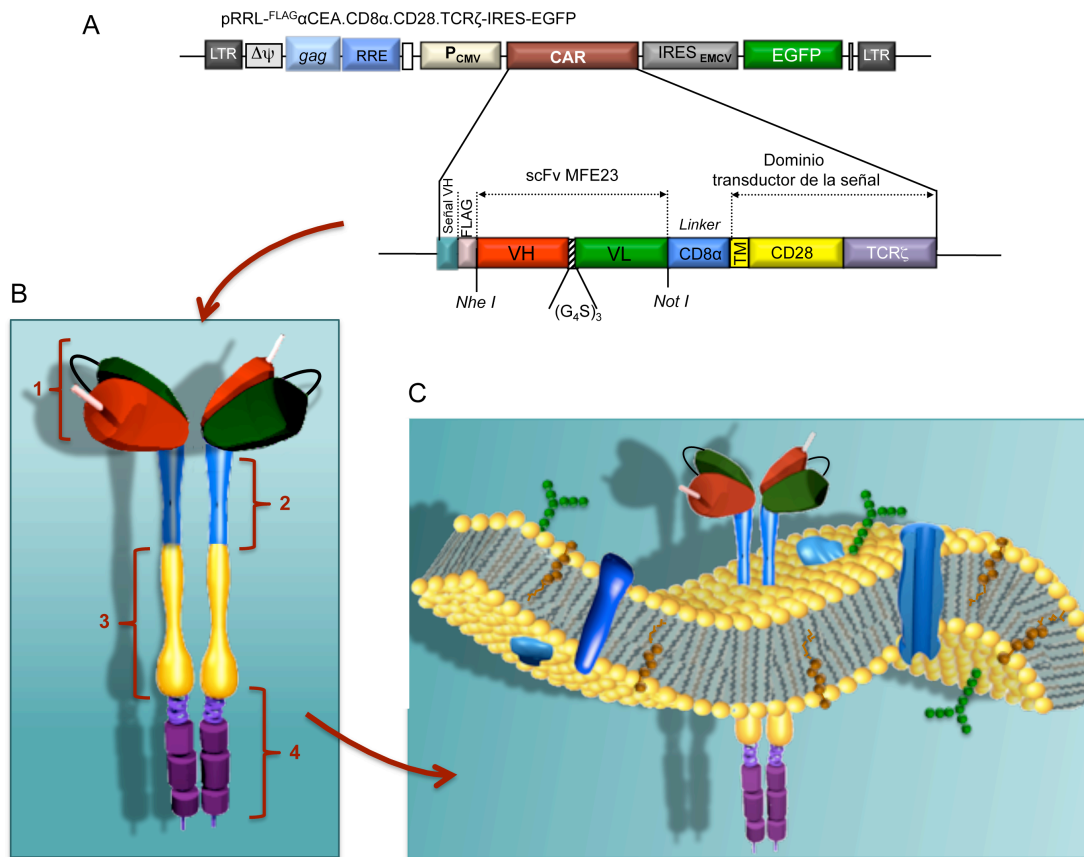


Figura 25: Representación esquemática del vector pRRL^{FLAG}αCEA.TCRζ-IRES-EGFP y de la estructura del CARv1. (A) LTR, repeticiones terminales largas (del inglés *long terminal repeats*) necesarias para el empaquetamiento de viriones e integración en el genoma de la célula; Δψ, señal ψ de empaquetamiento; RRE, elemento de respuesta a Rev; CMV, promotor constitutivo de citomegalovirus; ECMV IRES, sitio interno de entrada ribosomal del virus de la encefalomiocarditis; gag, gen de proteína empaquetadora de las partículas virales; EGFP, gen de la proteína verde fluorescente; CAR, receptor de antígeno quimérico. (B) El CARv1 está estructurado en tres segmentos: segmento de unión al antígeno (1), compuesto por el scFv MFE23 (anti-CEA), el segmento espaciador o bisagra (*hinge*) (2) y el segmento de transducción, compuesto por la porción transmembrana y citoplásmica del CD28 (3) y la cadena ζ del complejo TCR-CD3 (4) fusionadas en serie. (C) Representación del CARv1 integrado en la membrana plasmática celular.

2.4.3. TRANSDUCCIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR T HUMANA CON UN VECTOR LENTIVIRAL QUE CODIFICA UN CARv1 MULTISEGMENTO, CON ESPECIFICIDAD ANTITUMORAL

Dado que objetivo era generar una población de células T con altos niveles del CARv1 tumor-específico en superficie, las células Jurkat se transdujeron con el $LV^{\alpha\text{CEA.CARv1-EGFP}}$ a una MDI de 30. La expresión de EGFP, así como de la expresión en superficie del CARv1 en la población resultante ($\text{Jurkat}^{\alpha\text{CEA.CARv1}}$), se analizaron por CF (Figura 26). En CARv1 anti-CEA se expresó mejor que el CAR anti-CEA convencional en células Jurkat transducidas con el $LV^{\alpha\text{CEA.CAR-EGFP}}$ o con el $LV^{\alpha\text{CEA.CARv1-EGFP}}$ a la misma MDI (Figura 26).

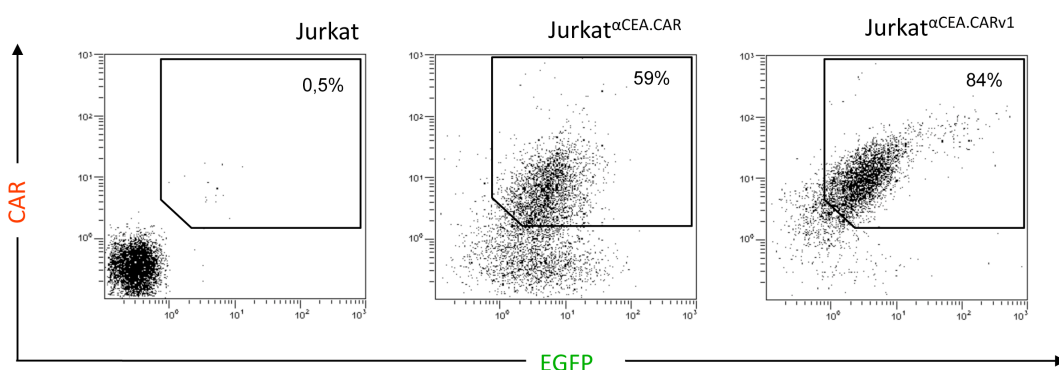


Figura 26: Caracterización fenotípica de la población $\text{Jurkat}^{\alpha\text{CEA.CARv1}}$. Análisis de la expresión de EGFP y CAR mediante CF, tras la transducción de células Jurkat con el $LV^{\alpha\text{CEA.CARv1-EGFP}}$ a una MDI de 30. Como controles de marcaje se emplearon células Jurkat y $\text{Jurkat}^{\alpha\text{CEA.CAR}}$.

2.4.3.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL

Para evaluar la funcionalidad del CARv1, se realizó un ensayo de activación a pequeña escala con células HeLa^{CEA} , comparando la población $\text{Jurkat}^{\alpha\text{CEA.CARv1}}$ con la población $\text{Jurkat}^{\alpha\text{CEA.CAR}}$. La eficacia de activación, evaluada mediante CF según el nivel de expresión de CD69, fue similar en ambas poblaciones (Figura 27). Una vez demostrada la funcionalidad del CARv1 anti-CEA, se realizó un ensayo de activación a pequeña escala utilizando cantidades decrecientes de células HeLa^{CEA} .

Como se observa en la Figura 28 en la población $\text{Jurkat}^{\alpha\text{CEA.CAR}}$ la proporción de células diana no alteró de manera significativa la eficacia de activación, mientras que en la población $\text{Jurkat}^{\alpha\text{CEA.CARv1}}$ la expresión de CD69 aumentaba al reducir el número de células diana.

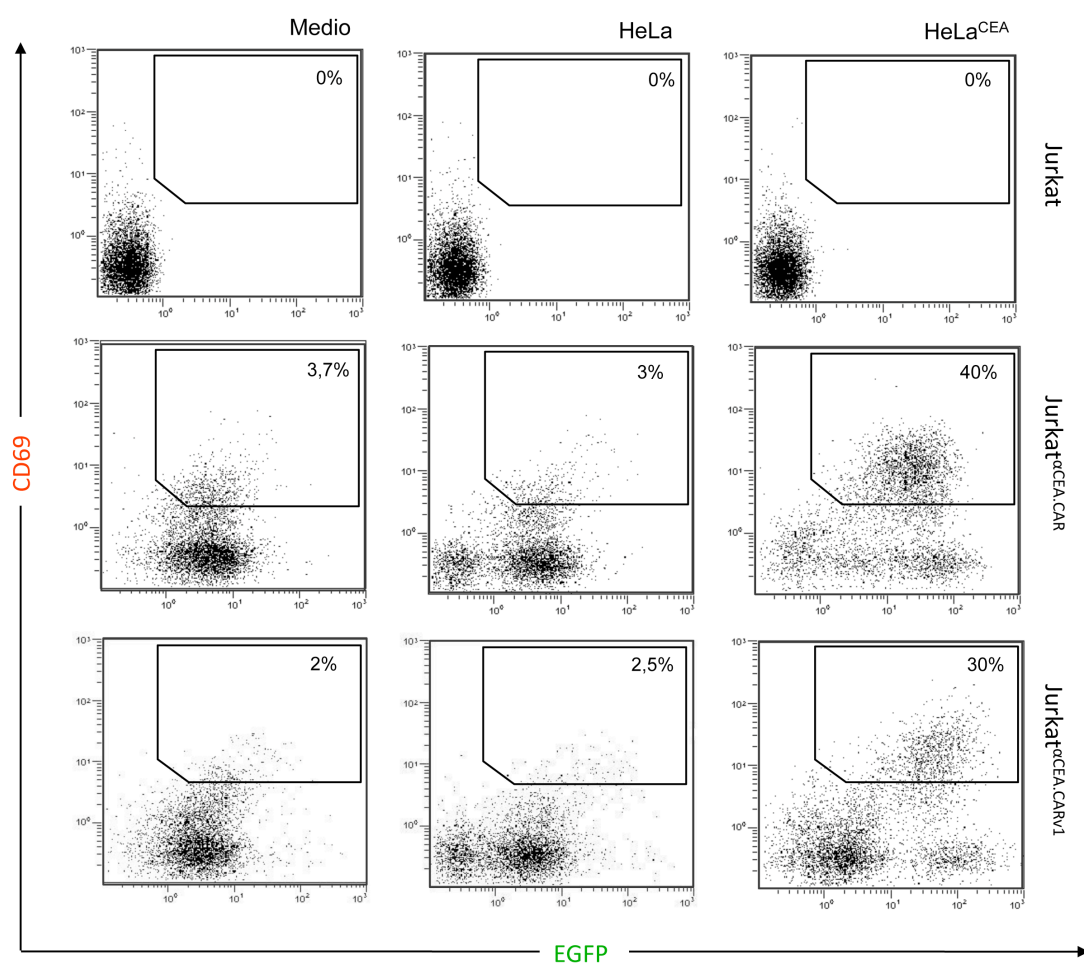


Figura 27: Caracterización funcional de la población Jurkat^{αCEA.CARv1}. Análisis mediante CF de la expresión de CD69 por células Jurkat, Jurkat^{αCEA.CAR} y Jurkat^{αCEA.CARv1} estimuladas en presencia de células diana (HeLa o HeLa^{CEA}) a una relación E:D = 1:1.

2.4.4. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES LENTIVIRALES QUE CODIFICAN PARA LOS ANTICUERPOS SELECCIONADOS (CARBODIES) EN FORMATO CARv1 .

Una vez comprobada la funcionalidad del CAR multisegmento y optimizado el ensayo de activación a pequeña escala, los scFvs S3.45 y S3.109, se clonaron en el vector lentiviral pRRL-^{FLAG}αNIP.CD8α.CD28.TCRζ-IRES-EGFP. Las partículas lentivirales (LV^{S3.45.CARv1-EGFP} y LV^{S3.109.CARv1-EGFP}) se obtuvieron y titularon siguiendo los protocolos habituales. Mediante titulación biológica se obtuvo un título de 3 x 10⁶ UT/ml para el LV^{S3.45.CARv1-EGFP} y 2 x 10⁶ UT/ml para el LV^{S3.109.CARv1-EGFP}.

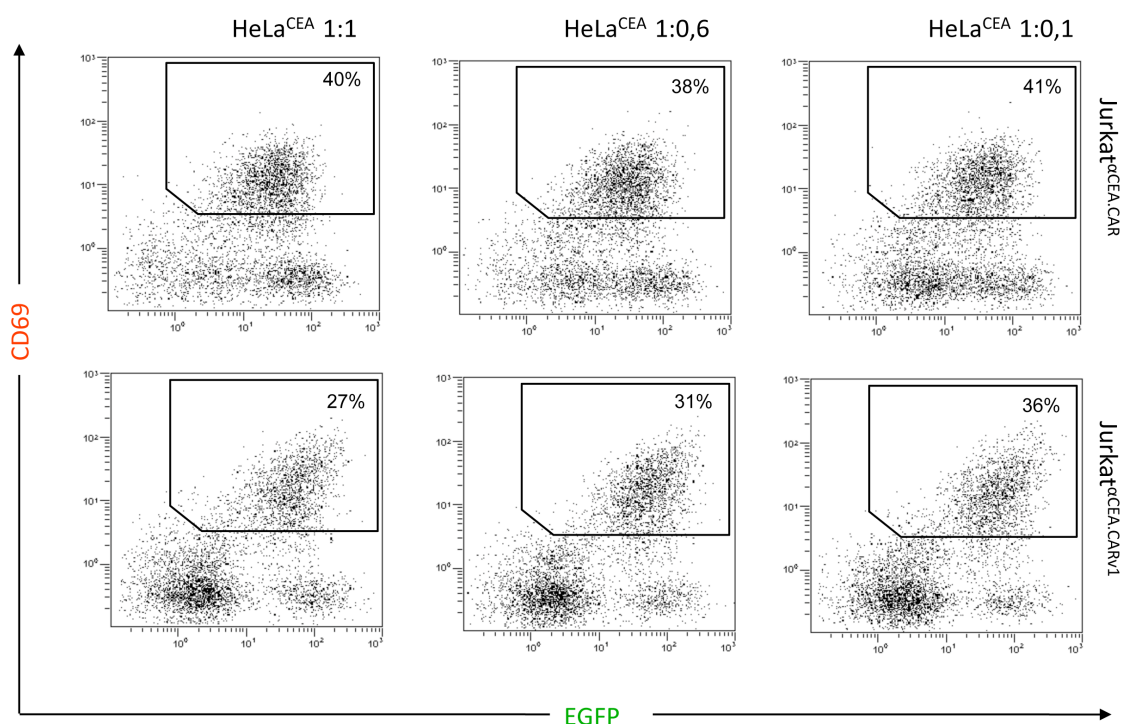


Figura 28: Caracterización funcional de la población Jurkat^{αCEA.CARv1} empleando relaciones E:D variables. Análisis mediante CF de la expresión de CD69 por células Jurkat^{αCEA.CAR} y Jurkat^{αCEA.CARv1} estimuladas en presencia de células HeLa^{CEA} empleando relaciones E:D 1:1, 1:0,6 y 1:0,1.

2.4.4.1. TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS T

Células Jurkat se transdujeron (MDI 30) con el LV^{S3.45.CARv1-EGFP} o con el LV^{S3.109.CARv1-EGFP}. La expresión de EGFP, así como de la expresión en superficie del CARv1 en las células transducidas (Jurkat^{S3.45.CARv1} y Jurkat^{S3.109.CARv1}), se analizó mediante CF (Figura 29). Mientras que la expresión de EGFP era similar en ambas poblaciones, el nivel de expresión de CARv1 era mayor en las células Jurkat^{S3.45.CARv1} que en las células Jurkat^{S3.109.CARv1}.

La población Jurkat^{S3.45.CARv1} expresaba niveles de CAR similares a los observados en la población Jurkat^{αCEA.CARv1} (Figura 29).

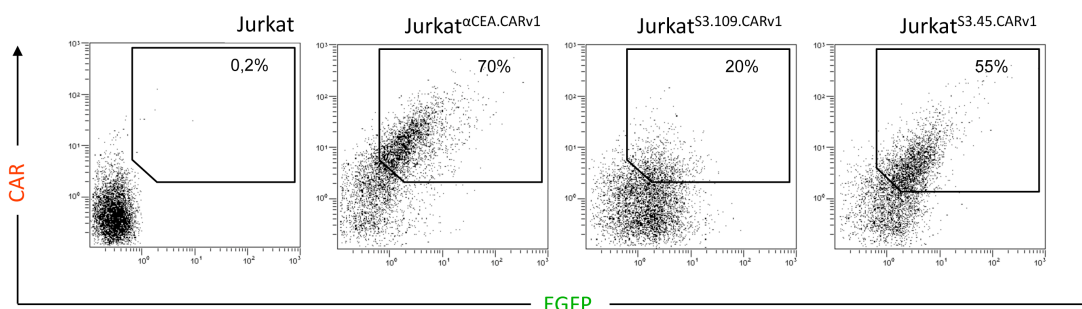


Figura 29: Caracterización fenotípica de las poblaciones Jurkat^{S3.109.CARv1} y Jurkat^{S3.45.CARv1}.

Análisis de la expresión de EGFP y CAR mediante CF, tras la transducción de células Jurkat con el LV^{S3.109.CARv1-EGFP} o con el LV^{S3.45.CARv1-EGFP} respectivamente a una MDI de 30. Como controles de marcaje se emplearon células Jurkat y Jurkat^{αCEA.CARv1}.

2.4.4.2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD Y LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS SELECCIONADOS (CARBODIES) EN FORMATO CARv1.

Para evaluar la funcionalidad de los anticuerpos seleccionados en formato CARv1, se realizó un ensayo de activación a pequeña escala con células HeLa, comparando la población Jurkat^{S3.45.CARv1} con la población Jurkat^{S3.109.CARv1}. Tras 16 horas se comprobó que la población Jurkat^{S3.45.CARv1} se activaba de forma mas eficiente y presentaba un porcentaje de células CD69⁺ mayor que en la población Jurkat^{S3.109.CARv1} (Figura 30). El porcentaje de células EGFP⁺CD69⁺ oscilo ente un 10 y un 13% en función de la relación E:D (Figura 30). Este dato es similar al observado en la población de Jurkat^{αCEA.CARv1} activada con células HeLa^{CEA}, donde el porcentaje de células EGFP⁺CD69⁺ oscilo ente un 15 y un 30% en función de la relación E:D; a pesar de tratarse de un CARv1 con un scFv de afinidad alta (MFE23). Estos resultados, conjuntamente con los obtenidos con los *CARBodies* solubles, demuestran que los clones seleccionados no sólo reconocen el antígeno en la superficie de la célula diana, sino que son capaces de producir la activación de las células T en un contexto de CAR multisegmento, validando de esta manera la plataforma SALT y la posibilidad de utilizar los *CARBodies* en protocolos de terapia adoptiva de células T.

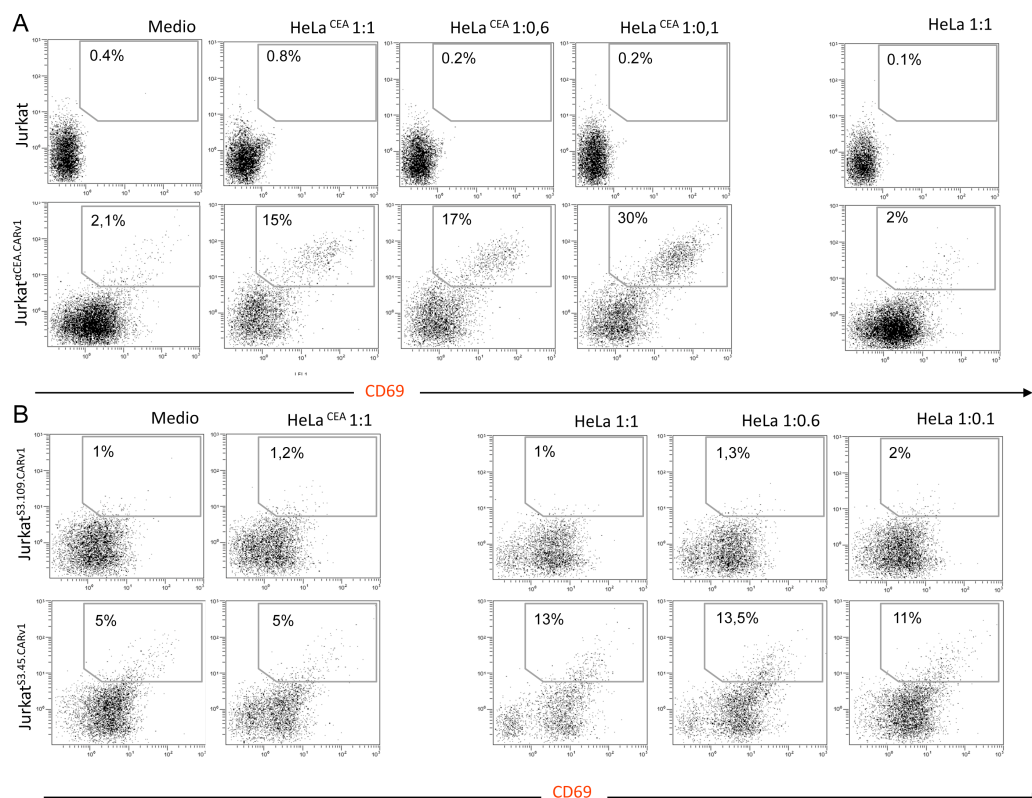


Figura 30: Caracterización funcional de las células Jurkat^{S3.109.CARv1} y Jurkat^{S3.45.CARv1}. Análisis mediante CF de la expresión de CD69 por las células Jurkat y Jurkat^{αCEA.CARv1} (A) estimuladas en presencia de células HeLa^{CEA} empleando relaciones E:D 1:1, 1:0,6 y 1:0,1; o células HeLa a una relación E:D=1:1; (B) Análisis mediante CF de la expresión de CD69 por las células Jurkat^{S3.109.CARv1} y Jurkat^{S3.45.CARv1} estimuladas en presencia de células diana HeLa empleando relaciones E:D 1:1, 1:0,6 y 1:0,1; o células HeLa^{CEA} a una relación E:D=1:1.

Para comprobar la especificidad del anticuerpo S3.45 en formato CARv1 se realizaron ensayos de activación de la población Jurkat^{S3.45.CARv1} con células HeLa, HT1080 y MDA-MB-231. El análisis de la expresión de CD69 por CF mostró que las células Jurkat^{S3.45.CARv1} se activan en presencia de los tres tipos celulares, a pesar de que los niveles de activación son superiores en los cocultivos con células HeLa (Figura 31).

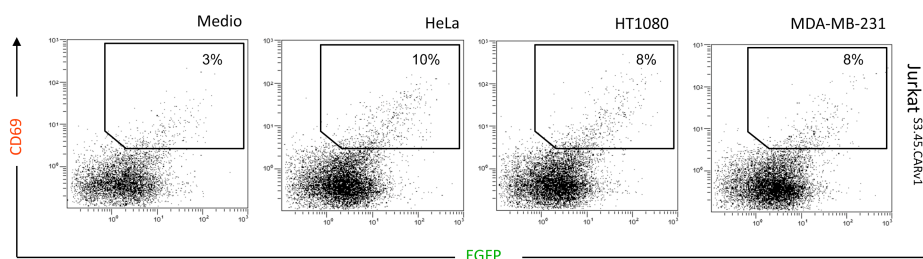


Figura 31: Caracterización funcional de la población Jurkat^{S3.45.CARv1} frente a distintas líneas tumorales. Análisis por CF de la expresión de CD69 por las Jurkat^{S3.45.CARv1} estimuladas en presencia de células diana (HeLa, HT1080 ó MDA-MB-231) a una relación E:D = 1:0.

3. SELECCIÓN *IN VIVO* DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES HUMANOS MEDIANTE LA PLATAFORMA SALT

3.1. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES QUE CODIFICAN REPERTORIOS DE ANTICUERPOS HUMANOS MONODOMINIO (V_H) EN FORMATO CAR (*GENOTECA SALT^{VH}*)

Con el objetivo de generar un repertorio de anticuerpos recombinantes humanos en formato CAR (*Genoteca SALT^{VH}*), optimizado para la selección *in vivo*, se construyó el vector lentiviral pRRL.^{FLAG}DAb.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP, a partir del vector pRRL.^{FLAG}aNIP.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP. Para ello, la región codificante del scFv anti-NIP B1.8, fue sustituida por un repertorio de anticuerpos humanos monodominio (V_H), derivado de la genoteca sintética DAb. El vector pRRL.^{FLAG}DAb.CD8 α .CD28.TCR ζ -IRES-EGFP incorpora en una única unidad transcripcional el gen del CAR, bajo el control del promotor CMV y el gen marcador EGFP, bajo el control de la secuencia IRES del virus EMCV.

El CAR está formado por los genes V_H del repertorio DAb con una etiqueta peptídica señal (FLAG), fusionado al CARv1 (Figura 32A). Diferentes diluciones de la suspensión bacteriana transformada con el vector conteniendo el repertorio, se sembraron en placas de medio sólido TYE suplementado con ampicilina para evaluar la diversidad potencial del repertorio. En función del número de colonias bacterianas obtenido y considerando la cantidad de ADN utilizada para la transformación, se calculó la diversidad teórica del repertorio en $5,6 \times 10^5$ clones distintos. Las partículas lentivirales (LV^{DAb.CARv1-EGFP}) se obtuvieron y se titularon siguiendo los protocolos habituales. Mediante titulación biológica se obtuvo un título de $5,5 \times 10^7$ UT/ml.

3.2. TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS T HUMANAS PARA LA EXPRESIÓN DEL REPERTORIO. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN OBTENIDA

Células Jurkat se transdujeron (MDI 1) con el LV^{DAb.CARv1-EGFP}. El análisis mediante CF de las células transducidas (Jurkat^{DAb.CARv1}), reveló que más de un 80% de

las células expresaban EGFP, mientras que el porcentaje de células que expresaban CARv1 a niveles apreciables era del 25% (Figura 32B).

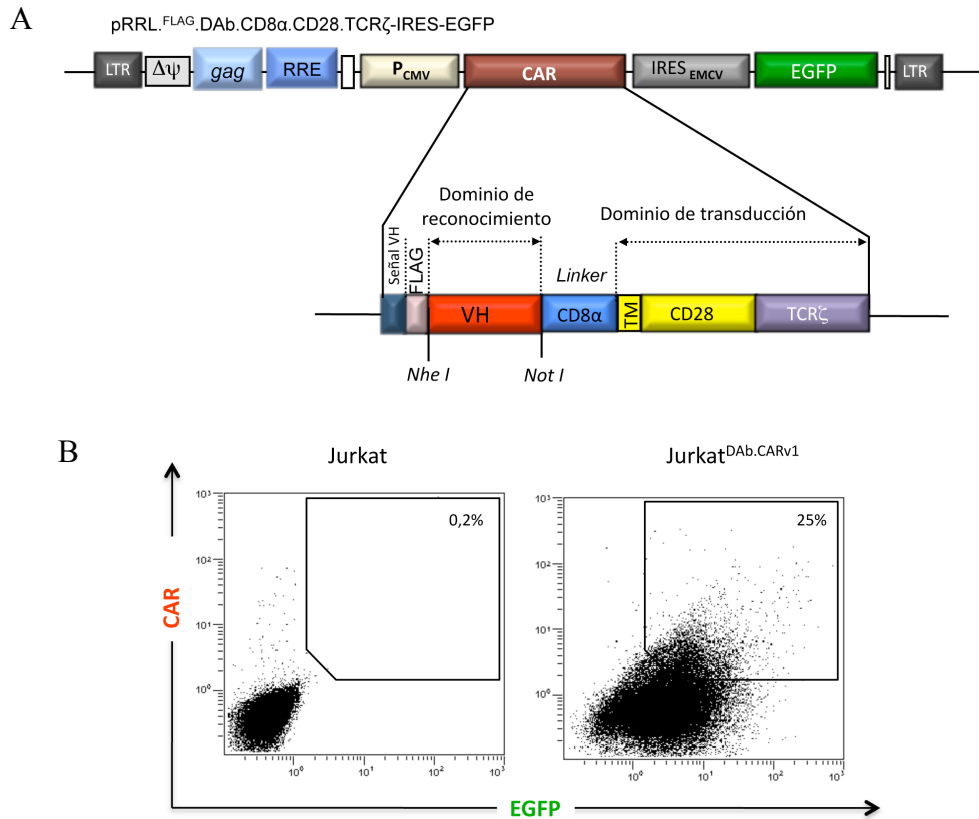


Figura 32: Representación esquemática del vector pRRL^{FLAG}DAbLibrary.CD8α.CD28.TCRζ-IRES-EGFP y caracterización fenotípica de la población Jurkat^{Dab.CARv1}. (A) Esquema de la construcción lentiviral. LTR, repeticiones terminales largas (del inglés *long terminal repeats*) necesarias para el empaquetamiento de viriones e integración en el genoma de la célula; $\Delta\psi$, señal ψ de empaquetamiento; RRE, elemento de respuesta a Rev; CMV, promotor constitutivo de citomegalovirus; ECMV IRES, sitio interno de entrada del ribosoma del virus de la encefalomiocarditis; gag, gen de proteína empaquetadora de las partículas virales; EGFP, gen de la proteína verde fluorescente; CAR, receptor de antígeno quimérico. El CAR está estructurado en tres segmentos: segmento de unión al antígeno (1), compuesto por un repertorio de anticuerpos monodominio (V_H) humanos, derivado de la genoteca sintética DAb; el segmento espaciador (2) formado compuesto por la región bisagra (*hinge*) de CD8α; y el segmento transductor de la señal (3), compuesto por las porciones transmembrana y citoplásmica de la cadena CD28 y la porción intracelular de la cadena ζ del complejo TCR-CD3 fusionadas en tándem. (B) Análisis de la expresión de EGFP y CAR mediante CF tras la transducción de células Jurkat con el LV^{Dab.CARv1-EGFP} a una MDI de 1.

3.3. SELECCIÓN DE ANTICUERPOS *IN VIVO* DE REPERTORIOS DE ANTICUERPOS V_H EN FORMATO CAR, EN RATONES PORTADORES DE TUMOR DE ORIGEN HUMANO

En estos estudios se utilizaron ratones hembra atímicos desnudos nu/nu de 6 semanas, en los que se implantaron células HeLa vía s.c. en la región dorsal. Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 0,2-0,3 cm³ se realizaron inoculaciones de poblaciones de células Jurkat o de células Jurkat^{Dab.CARv1} por vía i.v., vía i.c. o vía i.t. (Figura 33). Los tumores y los órganos (pulmones, hígado, bazo, ganglios linfáticos), se extrajeron a distintos tiempos tras la inoculación del repertorio, para estudiar la presencia de células Jurkat, así como para intentar su expansión *in vitro*. (Figura 33).

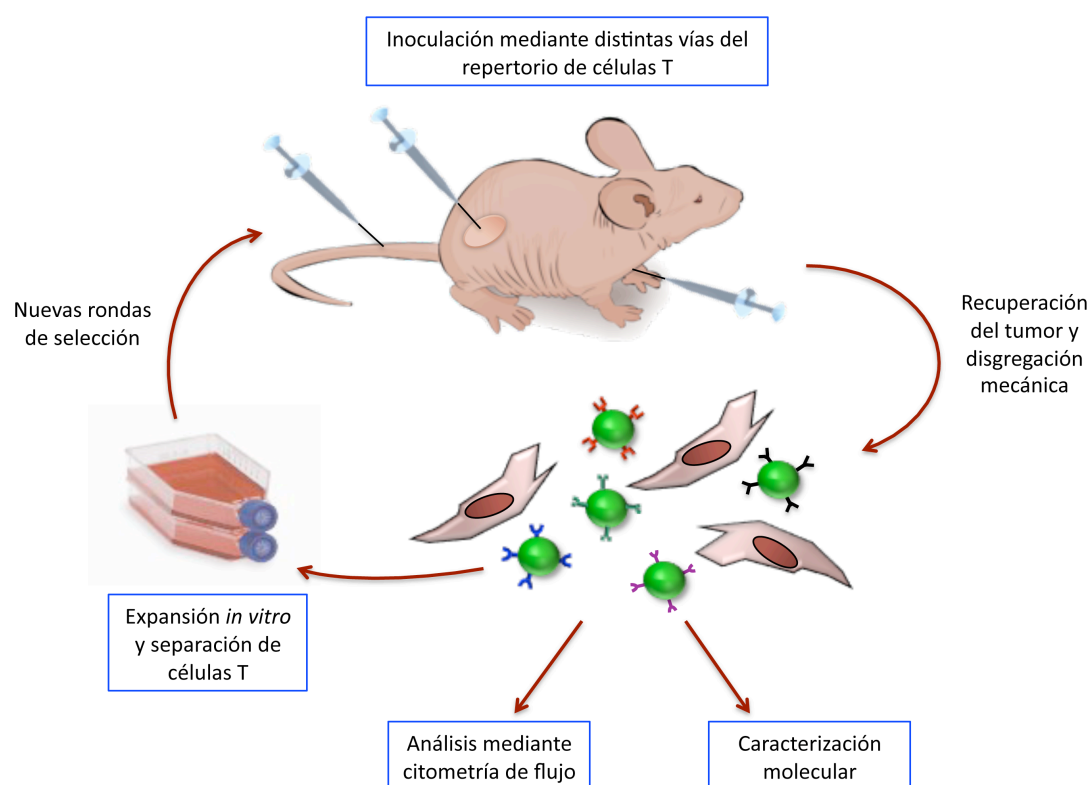


Figura 33: Representación esquemática del proceso de selección de Acs *in vivo* a partir de repertorios de anticuerpos V_H en formato CARv1 (Jurkat^{Dab.CARv1}). Las células Jurkat^{Dab.CARv1} se inoculan por vía i.v., i.c. o i.t. en ratones portadores tumores humanos (derivados de la línea celular HeLa) implantado en la región subcutánea dorsal. A tiempos distintos tras la inoculación de las células Jurkat^{Dab.CARv1}, se recuperan los tumores y se disgregan mecánicamente para proceder: caracterización molecular (1), análisis del porcentaje de células T en el tumor mediante CF (2), y expansión de las Jurkat^{Dab.CARv1} seleccionadas.

3.3.1. INOCULACIÓN VÍA INTRAVENOSA DEL REPERTORIO V_H

Se realizaron dos inoculaciones vía i.v. de 2×10^6 células Jurkat o células Jurkat^{DAb.CARv1} con un intervalo de 24 horas. Los animales se sacrificaron 24 horas después de la segunda inoculación para proceder a la extracción de los tumores así como de diferentes órganos, que se disgregaron mecánicamente para obtener una suspensión celular homogénea. La suspensión obtenida se dividió en dos alícuotas. Una se expandió *in vitro* en presencia de IL-2; la otra se marcó con un AcMo anti-CD45 o anti-CD3 humano conjugado con PE, para estudiar el porcentaje de células T en distintas localizaciones. No se detectó presencia de células Jurkat en ninguna de las localizaciones analizadas, mediante CF con un AcMo anti-CD3 humano (Figura 34). Igualmente, no fue posible expandir células T a partir de los disgregados tumorales cultivados *in vitro*.

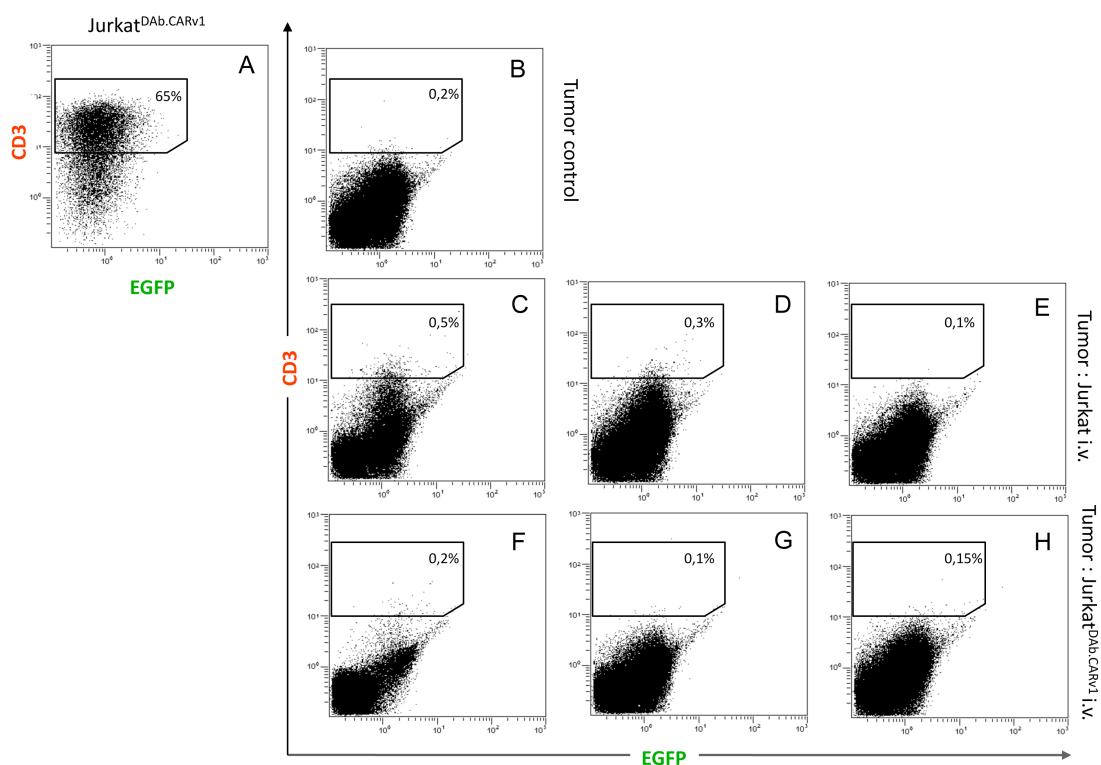


Figura 34: Análisis del porcentaje de células T intratumorales en ratones inoculados vía i.v. con la población Jurkat^{DAb.CARv1}. Las células T humanas se identificaron mediante CF tras el marcaje de los disgregados tumorales con un AcMo anti-CD3 humano conjugado con PE, en ratones que recibieron células Jurkat (C-E), y en ratones que recibieron células Jurkat^{DAb.CARv1} (F-H). Como controles de marcaje se emplearon células Jurkat^{DAb.CARv1} (A) y disgregados tumorales de ratones que no recibieron células Jurkat (B).

3.3.2. INOCULACIÓN VÍA INTRACARDIACA DEL REPERTORIO V_H

Se realizó una inyección vía i.c. de 1×10^7 células Jurkat o células Jurkat^{DAb.CARv1}. Los animales se sacrificaron a las 24 horas o a los 6 días postinoculación para proceder a la extracción de los tumores así como de diferentes órganos, que se disgregaron mecánicamente para obtener suspensiones celulares homogéneas. En este grupo tampoco se detectó presencia de células T en ninguna de las localizaciones analizadas, mediante CF con un AcMo anti-CD3 humano (Figura 35). Igualmente, no fue posible expandir células T a partir de los disgregados tumorales cultivados *in vitro*.

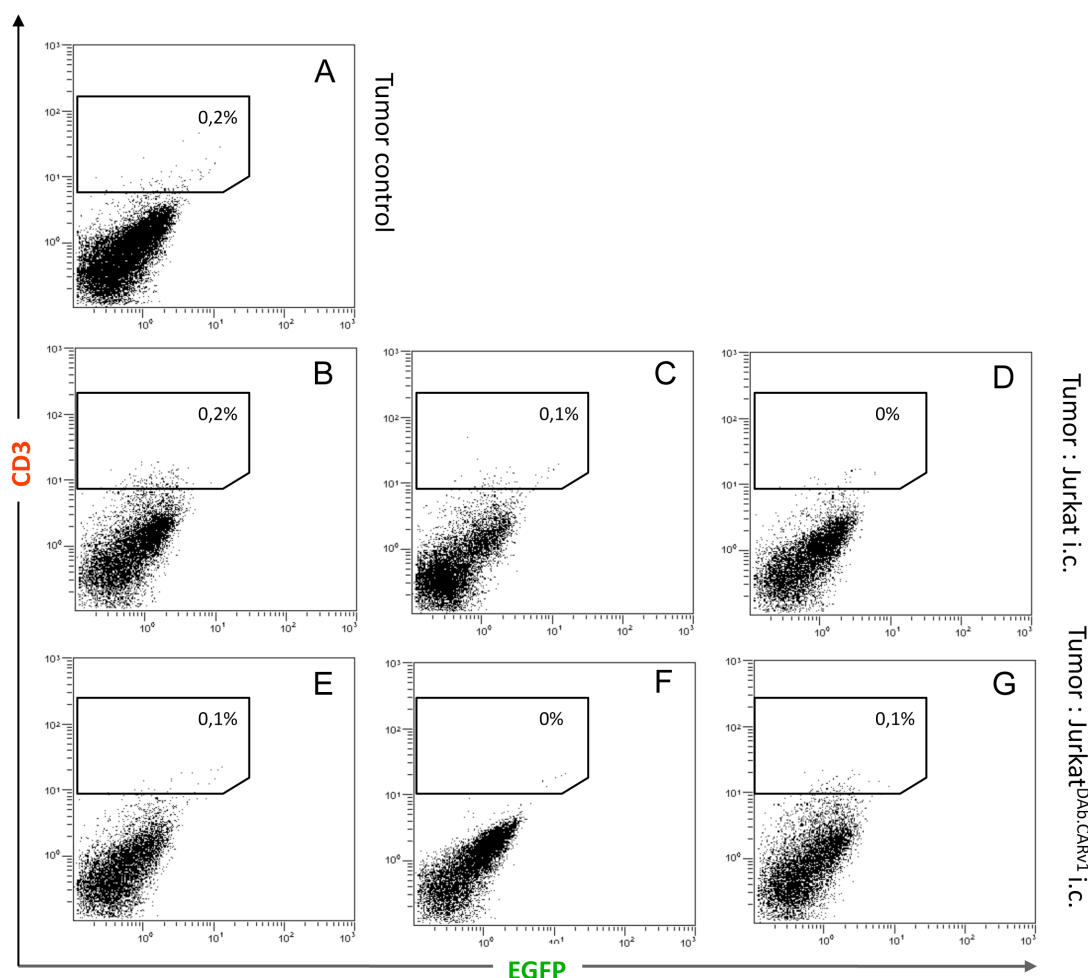


Figura 35: Análisis del porcentaje de células T intratumorales en ratones inoculados vía i.c. con poblaciones Jurkat^{DAb.CARv1}. Las células T humanas se identificaron mediante CF tras el marcaje de los disgregados tumorales con un AcMo anti-CD3 humano conjugado con PE, en ratones que recibieron células Jurkat (B-D) y en ratones que recibieron células Jurkat^{DAb.CARv1} (E-G). Como control de marcaje se emplearon disgregados tumorales de ratones que no recibieron células Jurkat (A).

3.3.3. INOCULACIÓN VÍA INTRATUMORAL DEL REPERTORIO V_H

Se realizó una inoculación vía i.t. de células Jurkat o células Jurkat^{DAb.CARv1}. Los animales se sacrificaron a los 30 minutos, a las 24 horas, o a los 4 días postinoculación para proceder a la extracción de los tumores así como de diferentes órganos, que se disgregaron mecánicamente para obtener suspensiones celulares homogéneas. En esta ocasión se sustituyó el AcMo anti-CD3 humano por un AcMo anti-CD45 humano, ya que la expresión de CD45 en la población Jurkat^{DAb.CARv1} era superior a la expresión de CD3, permitiendo una mejor identificación de las células T en los disgregados tumorales (Figura 34A y 36A). Mediante CF se detectaron células CD45⁺ en todos los disgregados tumorales, aunque el porcentaje se redujo al aumentar el tiempo transcurrido entre inoculación y extracción (Figuras 36, 37 y 38).

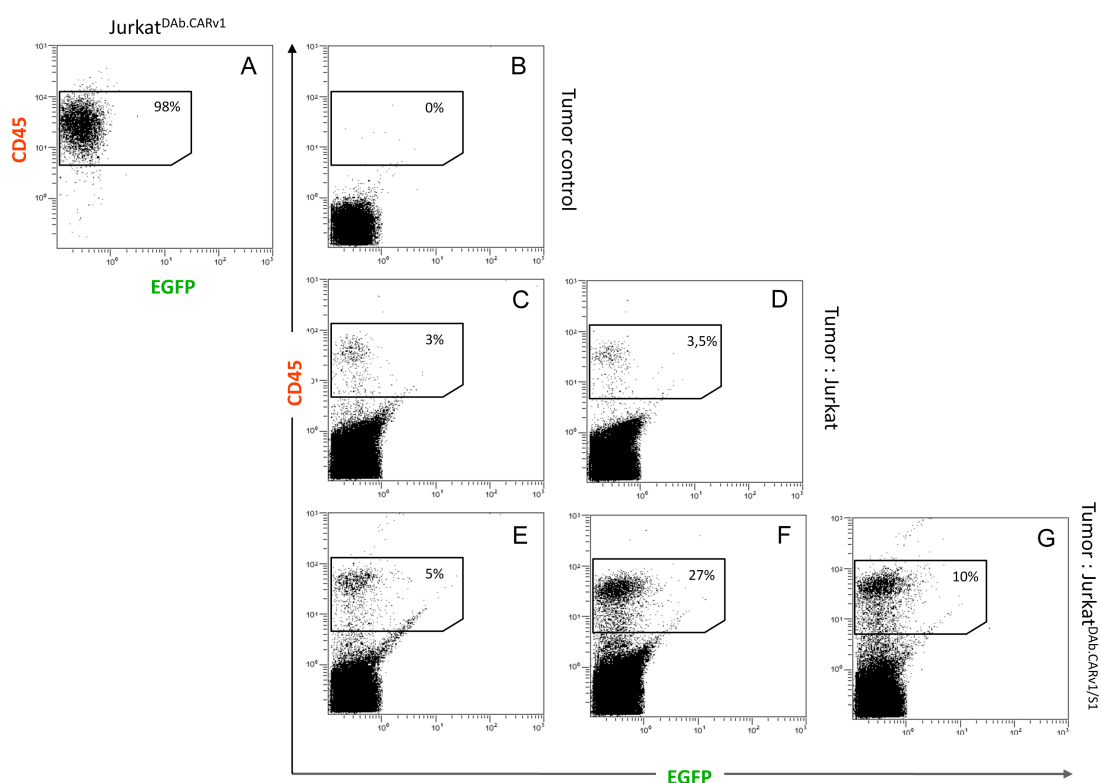


Figura 36: Análisis a los 30 minutos postinoculación, del porcentaje de células T intratumorales en ratones inoculados vía i.t. con la población Jurkat^{DAb.CARv1}. Las células T humanas se identificaron mediante CF tras el marcaje de los disgregados tumorales con un AcMo anti-CD45 conjugado con PE, en tumores de ratones control no inoculados con células Jurkat (B), en tumores de ratones inoculados con células Jurkat (C, D) y en tumores de ratones inoculados con células Jurkat^{DAb.CARv1} (E-G) a los 30 minutos postinoculación.

Es importante destacar que el porcentaje de células $CD45^+$ fue superior en los disgregados tumorales obtenidos de ratones que recibieron una inoculación i.t. de la población Jurkat^{DAb.CARv1}, que en los obtenidos de ratones que recibieron una inoculación i.t. de células Jurkat parentales (Figuras 36, 37 y 38). Esto fue especialmente evidente en las suspensiones celulares obtenidas a los 30 minutos y a las 24 horas postinoculación. Los disgregados tumorales obtenidos se expandieron *in vitro* y se realizó otro análisis mediante CF a los 7 días de cultivo. Como se observa en la Figura 39 en los cultivos generados a partir de los disgregados tumorales procedentes de ratones inoculados con la población Jurkat^{DAb.CARv1/S1}, el porcentaje de células T fue significativamente mayor que el de los disgregados obtenidos de los ratones inoculados con células Jurkat.

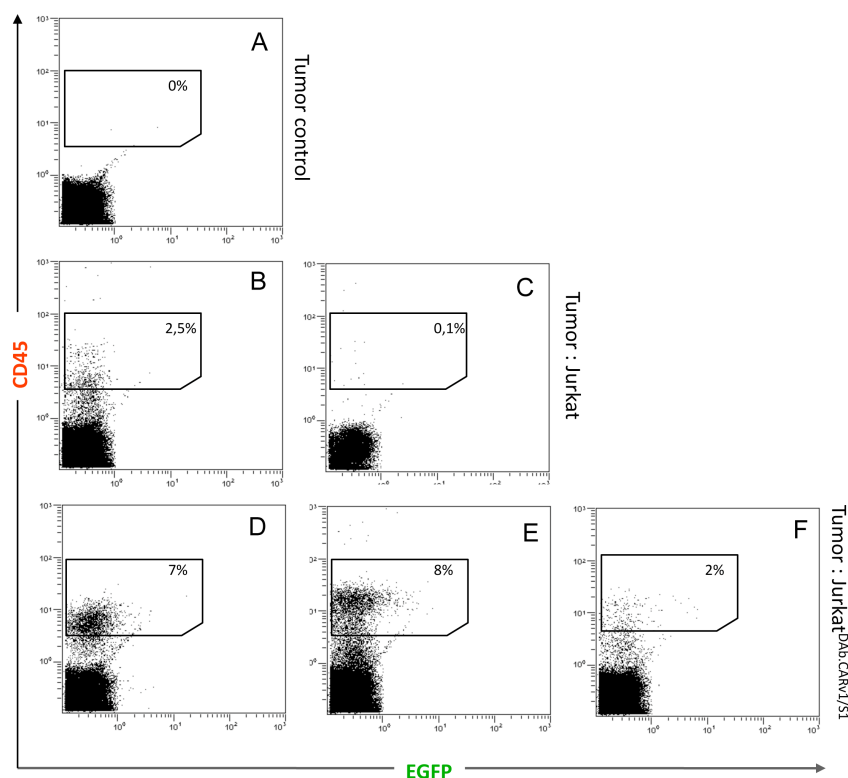


Figura 37: Análisis a las 24 horas postinoculación, del porcentaje de células T intratumorales en ratones inoculados vía i.t. con poblaciones Jurkat^{DAb.CARv1}. Las células T humanas se identificaron mediante CF tras el marcaje de los disgregados tumorales con un AcMo anti-CD45 conjugado con PE, en tumores de ratones control no inoculados con células Jurkat (A), en tumores de ratones inoculados con células Jurkat (B, C) y en tumores de ratones inoculados con células Jurkat^{DAb.CARv1} (D-F) a las 24 horas postinoculación.

Las células recuperadas a los 4 días postinoculación ($\text{Jurkat}^{\text{DAb.CARv1/S1}}$), se separaron de las células tumorales mediante centrifugación con gradiente de densidad y se expandieron *in vitro* durante 7 días, para proceder a una segunda ronda de selección mediante inoculación i.t. Tras esta segunda ronda, los tumores y los órganos se procesaron de la misma manera que en la primera ronda de selección, con la diferencia de que el sacrificio de los animales se realizó a los 4 días y 7 días postinoculación. Se detectaron células CD45^+ tanto a día 4 (Figura 40) como a día 7 (Figura 41), aunque la diferencias entre los ratones inoculados con células Jurkat y los inoculados con células $\text{Jurkat}^{\text{DAb.CARv1/S1}}$ no fueron significativas.

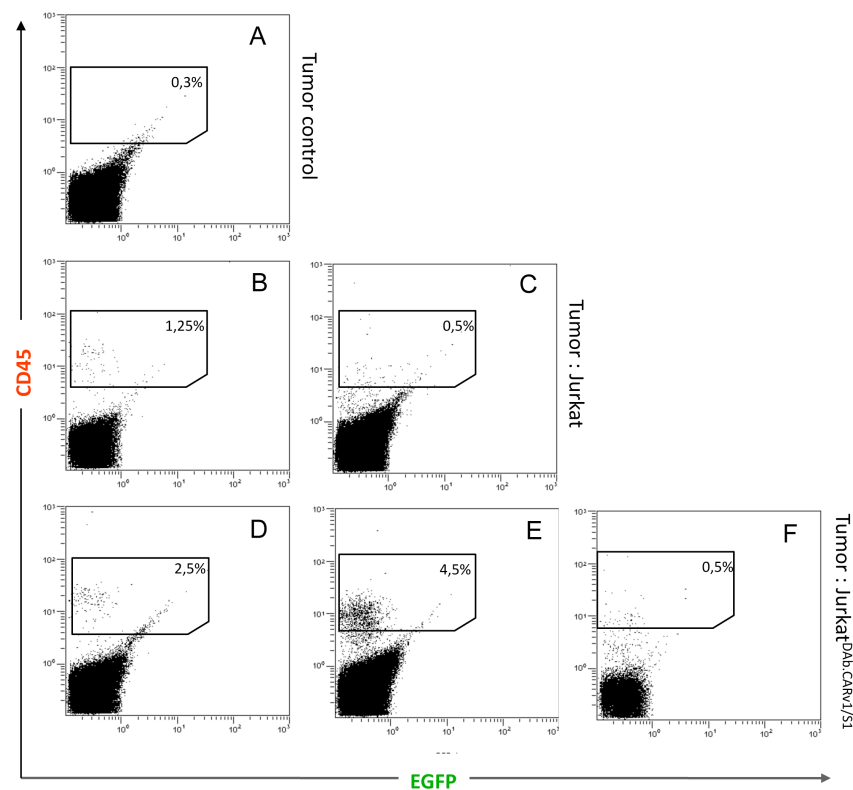


Figura 38: Análisis a los 4 días postinoculación, del porcentaje de células T intratumorales en ratones inoculados vía i.t. con poblaciones $\text{Jurkat}^{\text{DAb.CARv1}}$. Las células T humanas se identificaron mediante CF tras el marcaje de los disgregados tumorales con un AcMo anti-CD45 conjugado con PE, en tumores de ratones control no inoculados con células Jurkat (A), en tumores de ratones inoculados con células Jurkat (B, C) y en tumores de ratones inoculados con células $\text{Jurkat}^{\text{DAb.CARv1}}$ (D-F) a los 4 días postinoculación.

Las células recuperadas ($\text{Jurkat}^{\text{DAb.CARv1/S2}}$), se expandieron *in vitro* y separaron de las células HeLa por centrifugación con gradiente de densidad y se extrajo el ARN total, que se guardó a -80°C para un futuro análisis molecular del repertorio V_H obtenido.

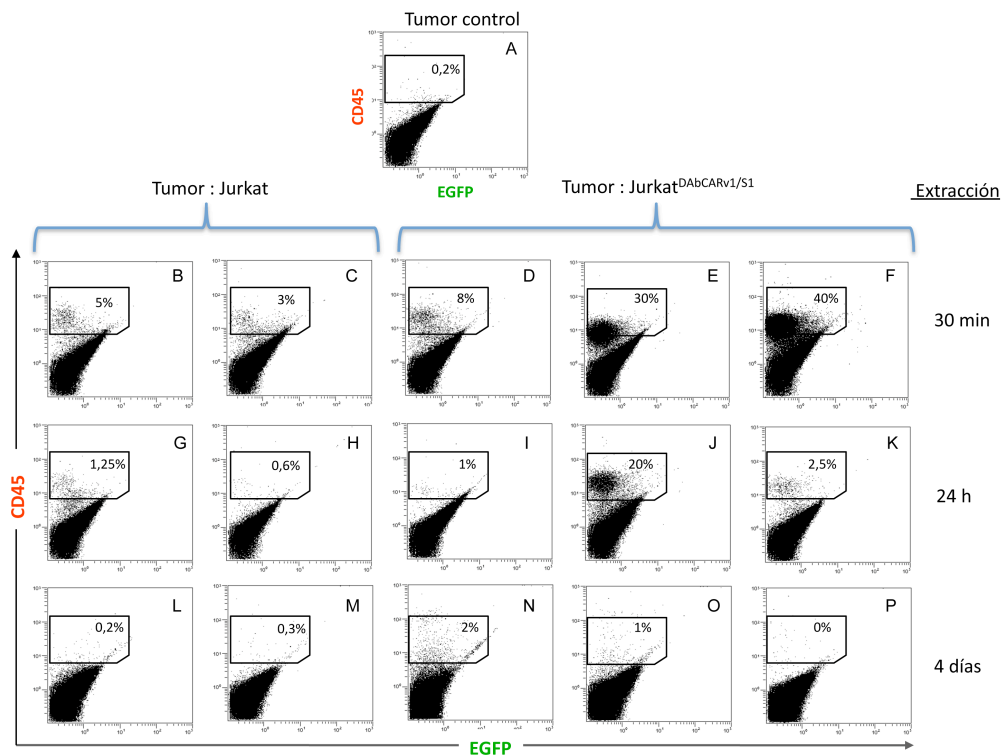


Figura 39: Análisis del porcentaje de células Jurkat^{Dab.CARv1/S1} tras la expansión *in vitro*.

Tras la expansión *in vitro* durante 7 días de los disgregados tumorales recuperados a los 30 minutos, 24 horas y 4 días de la inoculación por vía i.t. de las células Jurkat^{Dab.CARv1}, se realizó un marcaje con un AcMo anti-CD45 conjugado con PE y se determinó mediante CF la proporción de células T seleccionadas, en tumores de ratones control no inoculados con células Jurkat (A), en tumores de ratones inoculados con células Jurkat por vía i.t. (B, C, G, H, L, M) y en tumores de ratones inoculados con células Jurkat^{Dab.CARv1} por vía i.t. (D, E, F, I, J, K, N, O, P) y extraídos a los 30 minutos (B-F), 24 horas (G-K) y 4 días postinoculación (L-P).

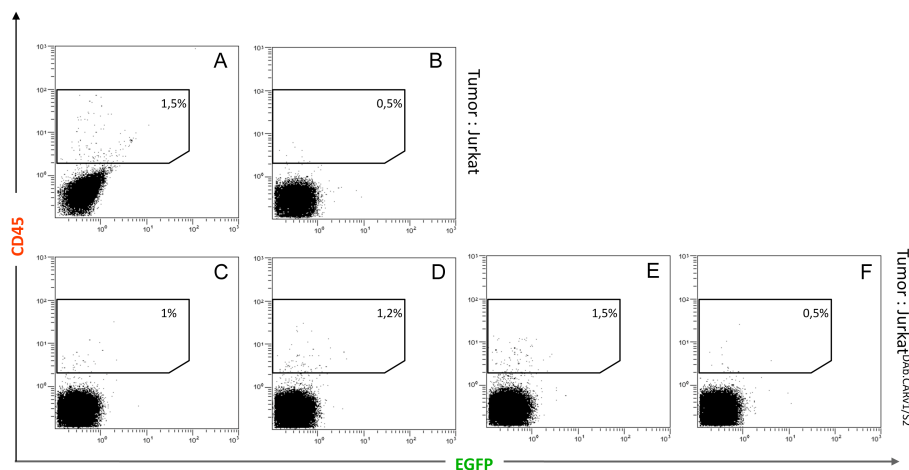


Figura 40: Análisis a los 4 días postinoculación, del porcentaje de células T intratumorales en ratones inoculados vía i.t. con células Jurkat^{Dab.CARv1/S1}. La proporción de células T recuperadas (Jurkat^{Dab.CARv1/S2}), a los 4 días postinoculación de células Jurkat^{Dab.CARv1/S1}, se evaluó mediante CF tras el marcaje de los disgregados tumorales con un AcMo anti-CD45 conjugado con PE, en tumores de ratones inoculados por vía i.t. con células Jurkat (A, B) o Jurkat^{Dab.CARv1/S1} (C-F).

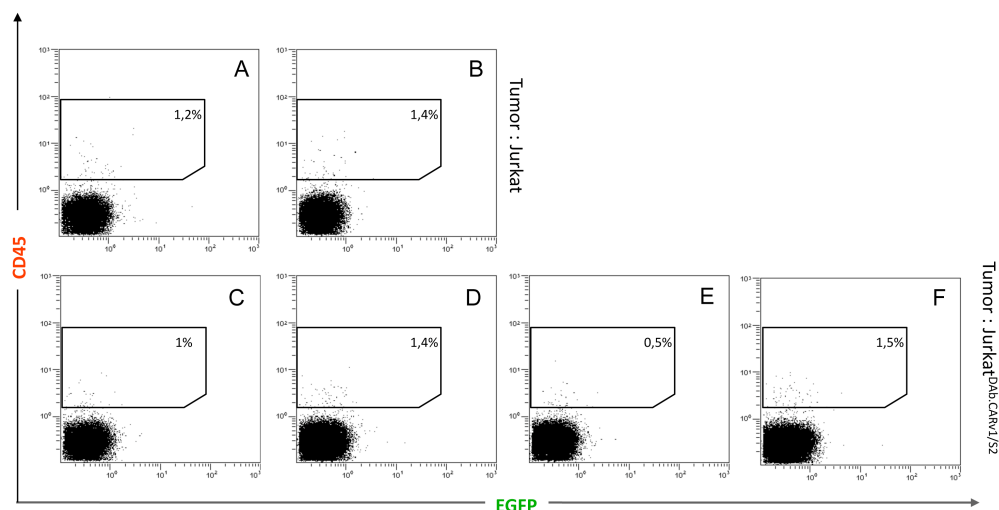


Figura 41: Análisis a los 7 días postinoculación, del porcentaje de células T intratumorales en ratones inoculados vía i.t. con células Jurkat^{Dab.CARv1/S1}. La proporción de células T recuperadas (Jurkat^{Dab.CARv1/S2}), a los 7 días postinoculación de células Jurkat^{Dab.CARv1/S1}, se evaluó mediante CF tras el marcaje de los disgregados tumorales con un AcMo anti-CD45 conjugado con PE, en tumores de ratones inoculados con células Jurkat por vía i.t. (A, B) y en tumores de ratones inoculados con células Jurkat^{Dab.CARv1/S1} por vía i.t. (C-F).

4. GENERACIÓN DE UN MODELO TUMORAL CON VASCULATURA HUMANA PARA LA SELECCIÓN *IN VIVO* DE ANTICUERPOS

4.1 DISEÑO DE CONSTRUCCIONES GÉNICAS PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA LUCIFERASA EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS

4.1.1. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR LENTIVIRAL QUE CODIFICA PARA EL GEN DE LA LUCIFERASA DE “*PHOTINUS PYRALIS*”

Para construir el vector pRRL-Luc-IRES-EGFP, se clonó la secuencia codificante del gen de la luciferasa (Luc) de luciérnaga (*Photinus pyralis*), extraída del plásmido comercial pGL3B, en el plásmido pRRL-IRES-EGFP (Figura 42A). Las partículas lentivirales (LV^{Luc-EGFP}) se obtuvieron y se titularon siguiendo los protocolos habituales. Mediante titulación biológica se obtuvo un título de 4×10^7 UT/ml.

4.1.2. TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS PRIMARIAS. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Células HUVEC de pase 1 ($7,5 \times 10^3$ células) se transdujeron con el $\text{LV}^{\text{Luc-EGFP}}$ (MDI 10). Más del 98% de las células transducidas ($\text{HUVEC}^{\text{Luc-EGFP}}$) expresaban niveles muy altos EGFP (Figura 42B) y la emisión de luz fue de aproximadamente 10 fotones/segundo/célula (Figura 42C). Para los experimentos *in vivo*, las células $\text{HUVEC}^{\text{Luc-EGFP}}$ fueron utilizadas en pases 3-5 postransducción.

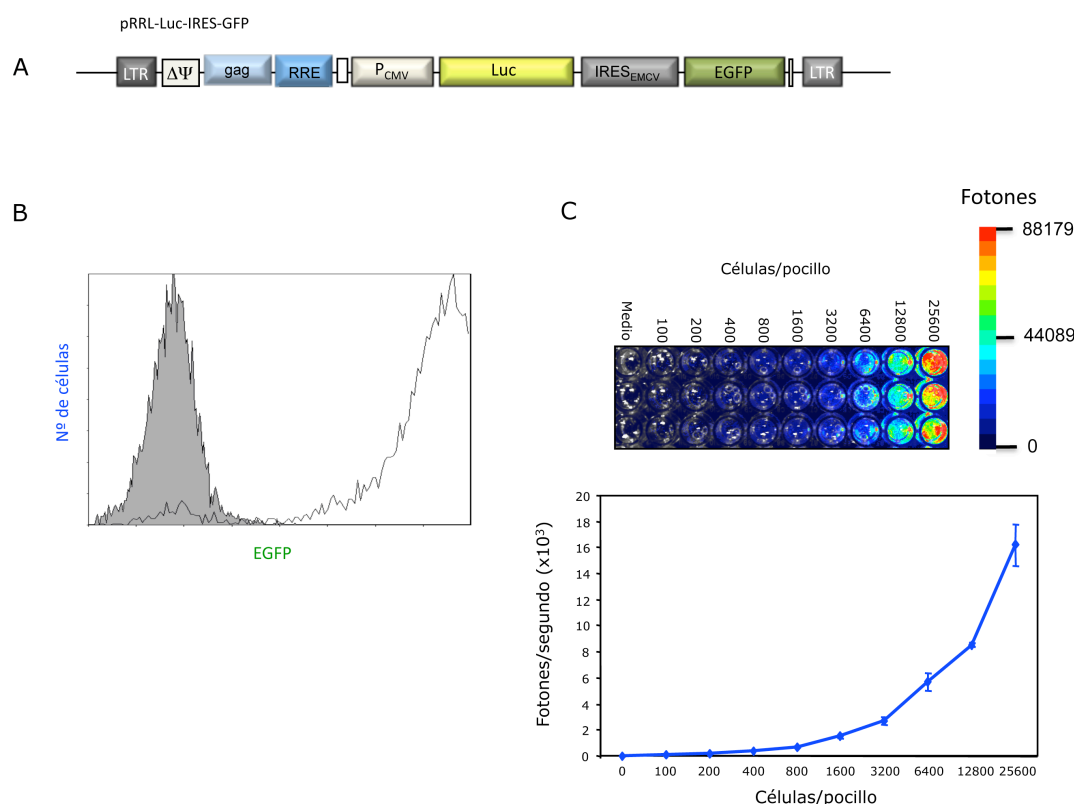


Figura 42: Representación esquemática del vector lentiviral pRRL-Luc-IRES-GFP y caracterización fenotípica y funcional de las células HUVEC transducidas. (A) Esquema de la construcción lentiviral. LTR, repeticiones terminales largas (del inglés *long terminal repeats*) necesarias para el empaquetamiento de viriones e integración en el genoma de la célula; $\Delta\psi$, señal ψ de empaquetamiento; RRE, elemento de respuesta a Rev; CMV, promotor constitutivo de citomegalovirus; EMCV IRES, sitio interno de entrada del ribosoma del virus de la encefalomiocarditis; gag, gen de proteína empaquetadora de las partículas virales; EGFP, gen de la proteína verde fluorescente; Luc, gen de la luciferasa de *Photinus pyralis*. (B) Análisis mediante CF de la expresión de EGFP de las células HUVEC transducidas con el $\text{LV}^{\text{Luc-EGFP}}$ ($\text{HUVEC}^{\text{Luc-EGFP}}$) a una MDI de 10. (C) Propiedades bioluminiscentes de las $\text{HUVEC}^{\text{Luc-EGFP}}$. Las células transducidas $\text{HUVEC}^{\text{Luc-EGFP}}$ se sometieron a diluciones seriadas en placas de 96 pocillos y la actividad BLI fue medida tras la adición del sustrato D-luciferina. En el gráfico se muestra la emisión media de fotones/segundo/pocillo \pm DE de pocillos evaluados por triplicado.

4.2. ESTABLECIMIENTO DE IMPLANTES TUMORALES CON VASCULATURA HUMANA

En trabajos anteriores (Sanz *et al*, 2008) hemos demostrado que es posible establecer redes vasculares humanas en un contexto murino, mediante la coimplantación de una mezcla de HUVEC y células mesenquimales humanas (MSC). La vasculatura resultante es funcional y establece anastomosis con el árbol vascular murino. Para estudiar la posibilidad de establecer xenotrasplantes de tumores humanos con vasculatura humana, mezclas de células de fibrosarcoma humano HT1080, células HUVEC^{Luc-EGFP} y MSCs (relación 4:4:1) fueron embebidas en Matrigel e inoculadas por vía s.c. en el área ventral de ratones atímicos desnudos (nu/un). Estos implantes se denominaron implantes tumorales-vasculares (I-TV). Como control se inocularon mezclas de HUVEC^{Luc-EGFP} y MSC (relación 4:1) embebidas en Matrigel e inoculadas por vía s.c. en el área ventral de los ratones. Estos implantes se denominaron implantes vasculares (I-V). También se inocularon células tumorales HT1080 sin componente vascular, denominados implantes tumorales (I-T). El crecimiento de los implantes se determinó mediante la medida del volumen tumoral a distintos tiempos. Las tasas de crecimiento tumoral no se vieron afectadas por la presencia de células HUVEC y MSC, ya que los implantes I-TV e I-T presentaron un crecimiento similar. Los implantes I-V, no modificaron su tamaño (Figura 43B).

Para cada ratón se realizaron medidas seriadas de la BLI *in vivo*, comenzando el día 1 postimplantación, mediante la inoculación del sustrato D-Luciferina por vía i.p. y captación de la señal luminiscente utilizando un sistema de imagen molecular (Figura 43A y C). A día 1 postimplantación, los I-TV mostraron una señal BLI mayor que los I-V control. A los 7 días postimplantación, todos los implantes mostraron un claro descenso en la señal BLI, que fue seguida de un incremento a partir del 10 postimplantación (Figura 43A y C). Este silenciamiento temporal de la emisión de luz seguido de una recuperación de la señal, puede estar relacionado con el tiempo requerido para el establecimiento de una red vascular funcional (Koike *et al*, 2004). La emisión de fotones resultó ser mucho mayor en los IT-V que en los I-V control hasta día 18 postimplantación, momento a partir del cual los I-TV mostraron una pérdida progresiva de la señal, que además mostraba un claro patrón de polarización (Figura 43A). Ambos procesos podrían estar relacionados con un efecto de dispersión de la

señal BLI debido al crecimiento tumoral, y/o con la sustitución de los vasos humanos por vasos murinos.

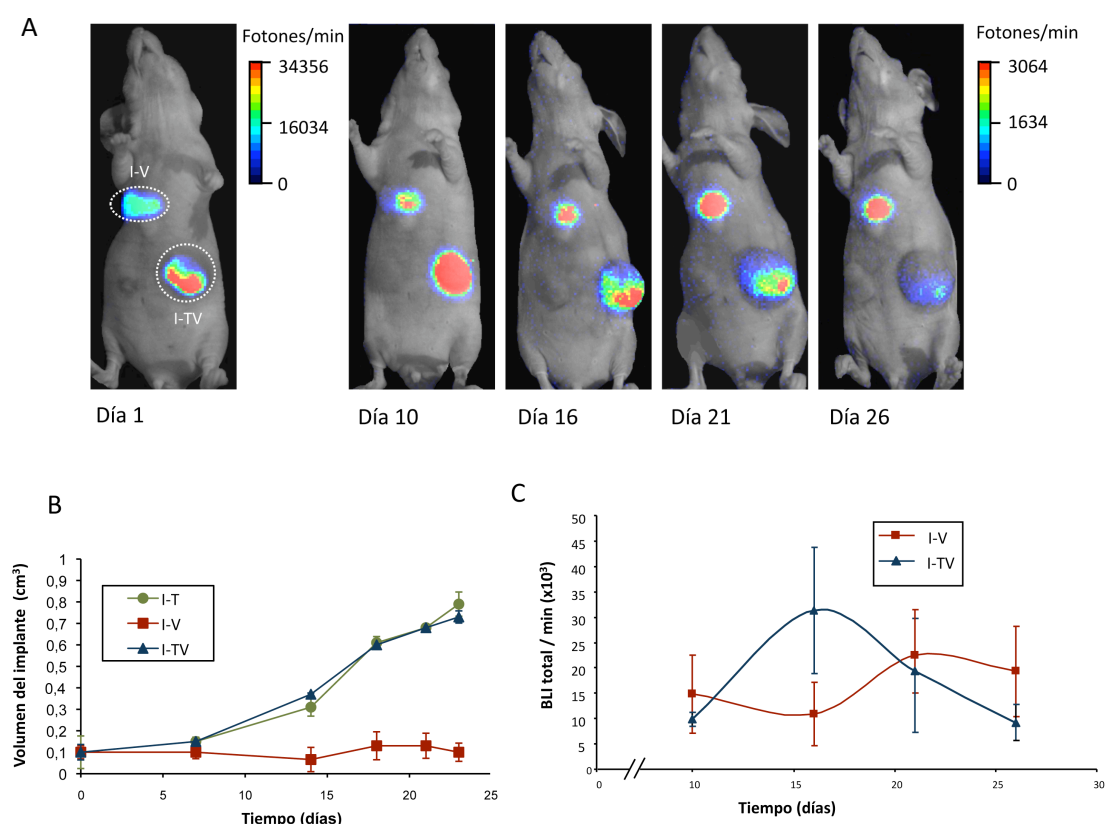


Figura 43: Seguimiento no invasivo del crecimiento y progresión de los implantes tumorales vasculares (I-TV), de los implantes tumorales (I-T) y de los implantes vasculares (I-V). (A) Imagen de BLI/minuto en un ratón representativo (total n=3 ratones por grupo) a los días 1, 10, 16, 21 y 26 tras la implantación de los I-TV e I-V. (B) Seguimiento del crecimiento de los implantes I-T e I-TV inoculados por vía s.c. (n=4 ratones por grupo) (C) Cuantificación de la señal de BLI en los implantes I-TV e I-V (n=4 ratones por grupo). Medias \pm DE representadas.

4.3. ESTUDIO DEL ORIGEN HUMANO O MURINO DE LA VASCULATURA

Para intentar determinar la/s causa/s del descenso de la señal BLI y poder correlacionarlo con posibles cambios morfológicos, los I-TV se recuperaron a distintos tiempos postimplantación (días 10, 16 y 21), se procesaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina. En todos los casos se detectaron estructuras vasculares con lumen que contenía eritrocitos (Figura 44A y B). El origen humano o murino de la vasculatura

se determinó mediante inmunohistoquímica con un AcMo anti-CD34 humano y un AcMo anti-CD34 murino (Figura 44 C-F).

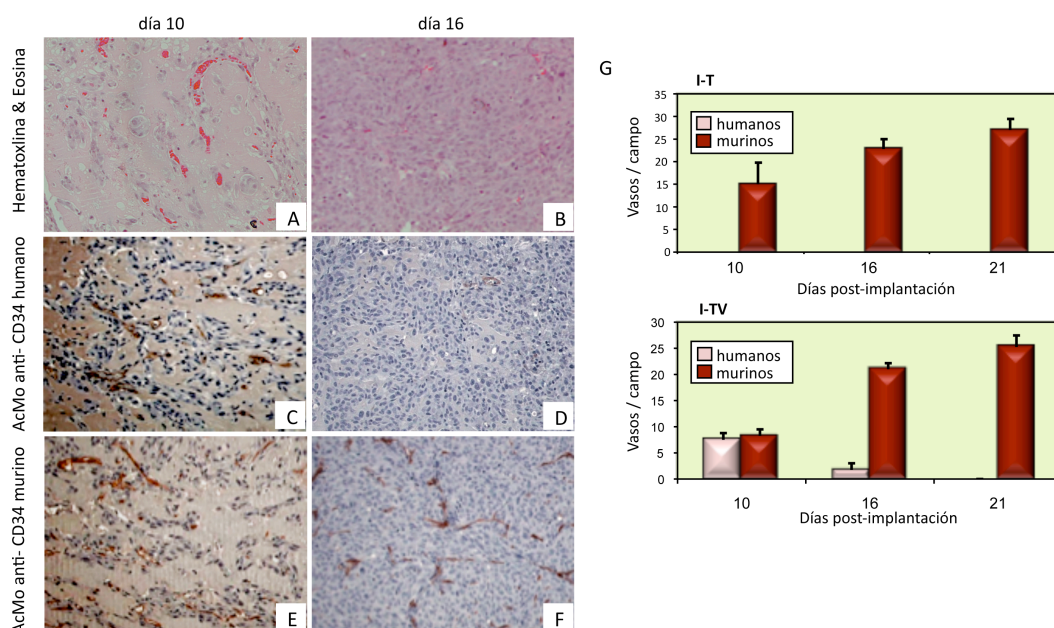


Figura 44: Evaluación histológica de los implantes. (A, B) Análisis mediante hematoxilina & eosina de la presencia de estructuras vasculares. El origen humano o murino de la vasculatura se determinó mediante inmunohistoquímica con un AcMo anti-CD34 humano (C, D) y un AcMo anti-CD34 murino (E, F) a los días 10 (C, E) y 16 (D, F). (G) Los vasos humanos y murinos de los implantes I-T o I-TV fueron cuantificados en 5 campos por sección en un total de 4 secciones por ratón a días 10, 16 y 21. Medias \pm DE representadas.

A día 10 postimplantación, el 40-50% de los vasos eran de origen humano (Figura 44G), mientras que a día 16, el componente vascular humano había sido casi completamente sustituido por vasos murinos (Figura 44G). A día 21 no se observó marcaje con el AcMo anti-CD34 humano. Por tanto, se demostró una correlación entre el descenso de la señal BLI y la sustitución por vasos murinos. En el implante control I-T, todos los vasos eran de origen murino (Figura 44G).

4.4. EFECTO DE LA IRRADIACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL Y LA VASCULATURA

4.4.1. IRRADIACIÓN LOCALIZADA E IRRADIACIÓN GENERAL SUBLETAL Y ESTABLECIMIENTO DE LOS IMPLANTES TUMORALES-VASCULARES.

En uno de los modelos, el área de inoculación del implante, situada en la región media-ventral del animal, fue irradiada 5 días antes de la inoculación de los I-TV utilizando una fuente de electrones a una dosis de 20Gy, suficiente para inhibir la angiogénesis local (Udagawa *et al*, 2007). En el otro modelo, se realizó una irradiación general subletal 24 horas antes de la implantación utilizando una unidad de rayos de cobalto. Como control se utilizó un tercer grupo de ratones no irradiados. Las diferencias entre los grupos irradiados de forma general, irradiados localmente y no irradiados resultaron ser significativas ($p \leq 0,001$), tanto en ratones portadores de IT como en ratones portadores de I-TV (Figuras 45A y 46A y B).

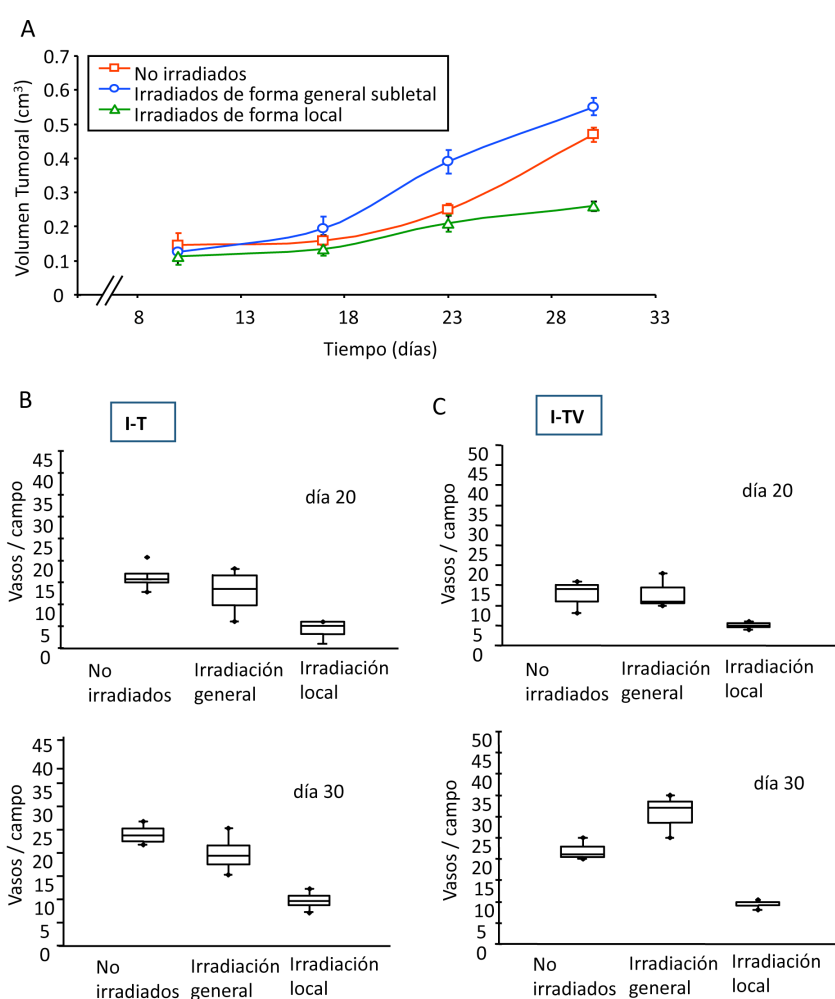


Figura 45: Efecto de la irradiación sobre el crecimiento de los implantes y la densidad vascular. (A) Efecto de la irradiación local o general subletal en el crecimiento de los implantes I-TV ($n=3$ ratones por grupo). (B, C) Cambios temporales (días 20 y 30) en la densidad vascular (media \pm DE de 5 campos por sección en un total de 4 secciones por ratón) en los I-T (B) e I-TV (C) de ratones control no irradiados, ratones irradiados de forma general subletal y ratones irradiados de forma local ($n=3$ ratones por grupo).

La cinética de crecimiento mostró que en los ratones irradiados localmente, el crecimiento tumoral fue significativamente menor (Figura 45A) que en los ratones no irradiados y que en los ratones irradiados de forma general. En cambio, la señal BLI de los I-TV de los ratones irradiados localmente, aunque inferior a la señal de los ratones irradiados de forma general subletal, era superior a la de los ratones control no irradiados (Figura 46A y B). El grupo irradiado subletalmente fue el que presentó la tasa de crecimiento tumoral más alta, así como mayor BLI de los tres grupos (Figuras 45A y 46A y B).

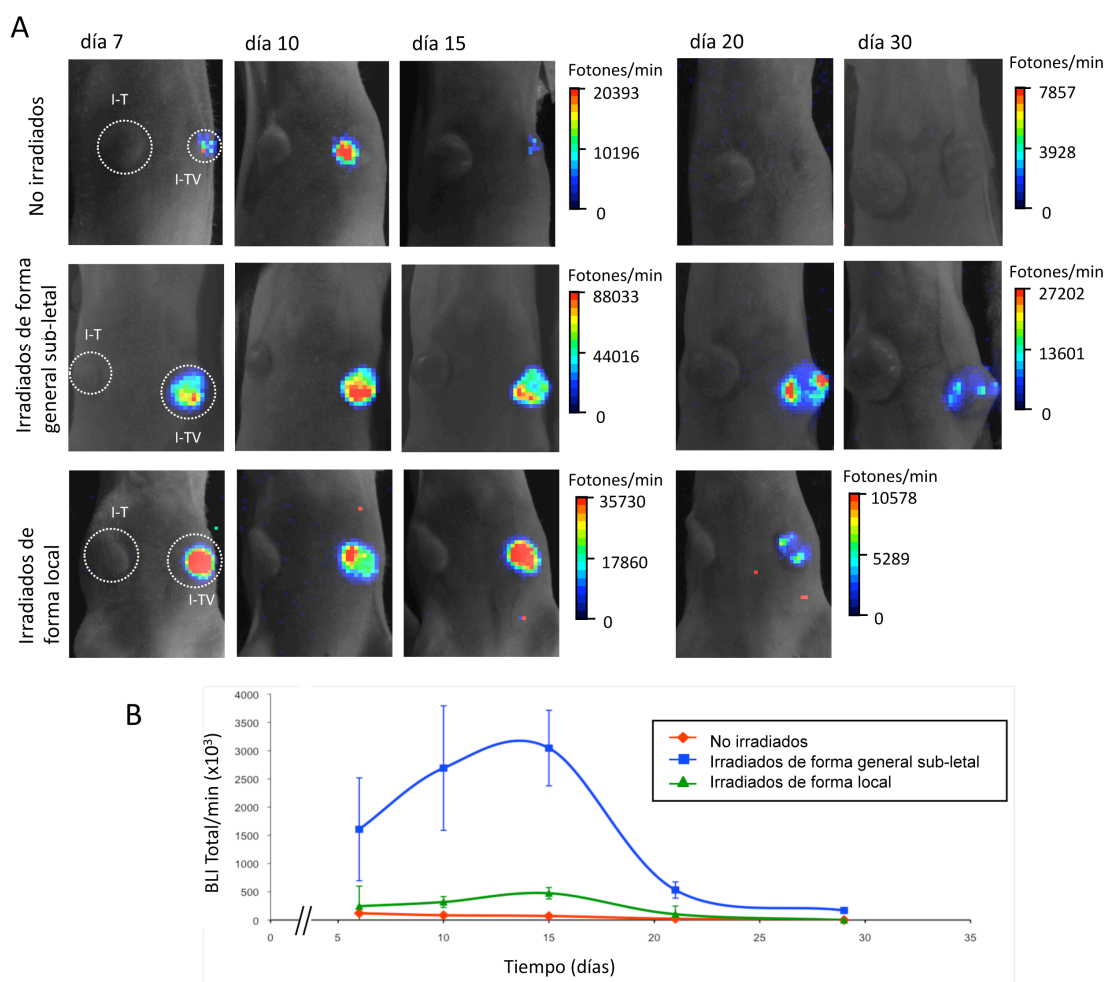


Figura 46: Efecto de la irradiación sobre la señal de BLI en ratones portadores de I-TV. (A) Señal de BLI de un ratón representativo de los grupos control no irradiados, irradiados de forma general subletal e irradiados de forma local (n=3 ratones por grupo) a días 7, 10, 15, 20 y 30 tras la implantación de los I-T o I-TV. (B) Cuantificación de la señal de BLI en los implantes I-TV (n=3 ratones por grupo) de ratones control no irradiados, irradiados de forma general subletal e irradiados de forma local. Medias \pm DE representadas.

En las dos primeras semanas postimplantación, los I-TV de este grupo mostraron un incremento significativo de la señal BLI (Figura 46A y B), pero a partir de este momento la señal empezó a disminuir. Aún así se detectó una señal BLI mayor que la del grupo control no irradiado, incluso hasta día 30 tras la implantación (Figura 46A y B).

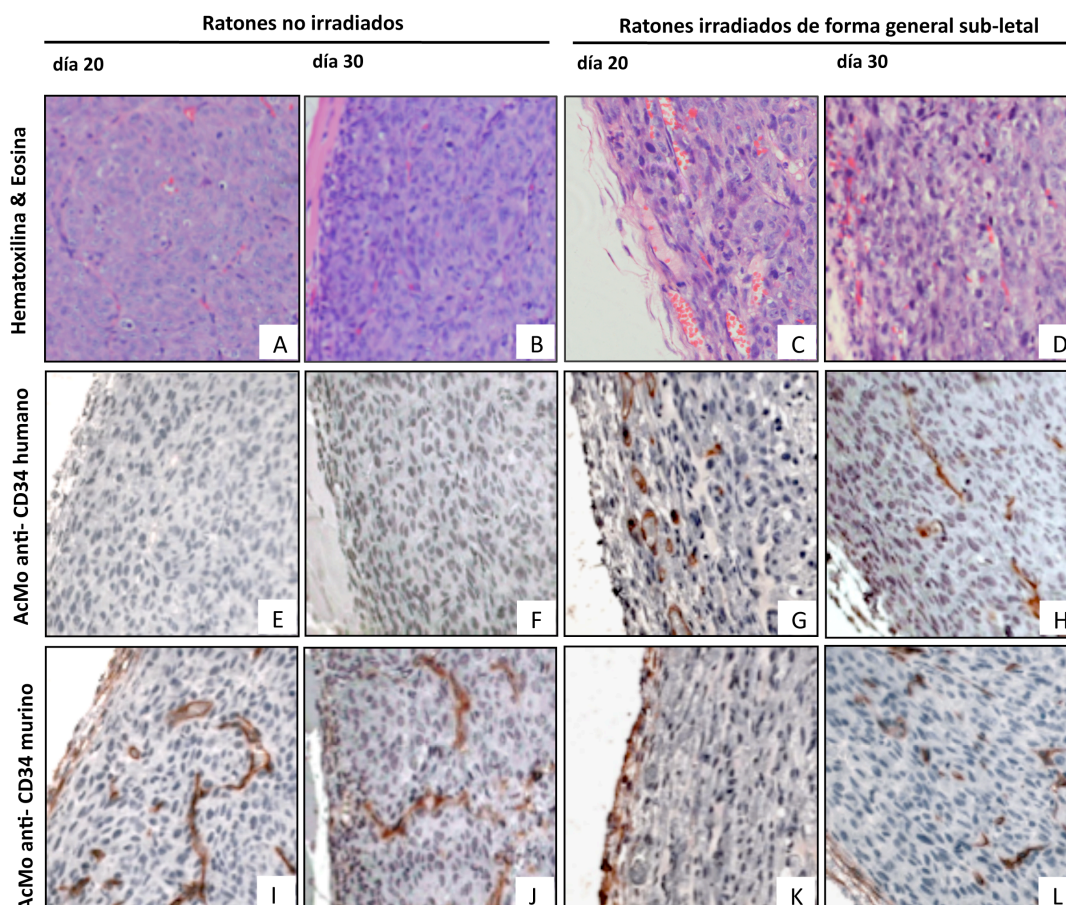


Figura 47: Evaluación histológica de los implantes en ratones irradiados. (A-D) Análisis mediante hematoxilina & eosina de la presencia de estructuras vasculares en los I-TV de ratones no irradiados (A, B) e irradiados de forma general subletal (C, D), a días 20 (A, C) y 30 (B, D) tras la implantación. El origen humano o murino de la vasculatura se determinó mediante inmunohistoquímica con un AcMo anti-CD34 humano (E-H) y un AcMo anti-CD34 murino (I-L) a días 20 (E, G, I, K) y 30 (F, H, J, L) en ratones no irradiados (E, F, I, J) y radiados de forma general subletal (G, H, K, L).

El análisis histológico de los IT e I-TV de los ratones irradiados localmente demostró un bajo número de vasos funcionales (aquellos con eritrocitos en su interior) en comparación con los implantes de los animales no irradiados (Figura 45B y C). Sin embargo, en los ratones irradiados subletalmente, a pesar de que los IT tenían un

menor número de estructuras vasculares en comparación con los animales no irradiados ($p=0,014$), los I-TV presentaban mayor densidad vascular que los I-TV de los animales no radiados ($p=0.004$) (Figura 45B y C).

4.4.2 ESTUDIO DEL ORIGEN HUMANO O MURINO DE LA VASCULATURA

Mientras que en el grupo no irradiado los vasos de origen humano fueron sustituidos casi completamente a día 20 por vasos de origen murino (Figura 47 y 48), en el grupo de animales irradiados de forma general, los vasos humanos constituían un 50% de la vasculatura total del implante. Es interesante destacar que los vasos de origen murino se encontraban principalmente en la periferia tumoral, mientras que los de origen humano se distribuían uniformemente por todo el área tumoral viable (Figura 47 y 48). A partir de día 20, los vasos murinos colonizaron de forma progresiva el tumor, pero el componente vascular humano continuó constituyendo una parte importante de la red vascular, siendo aproximadamente un 30% de la vasculatura tumoral a día 30 postimplantación.

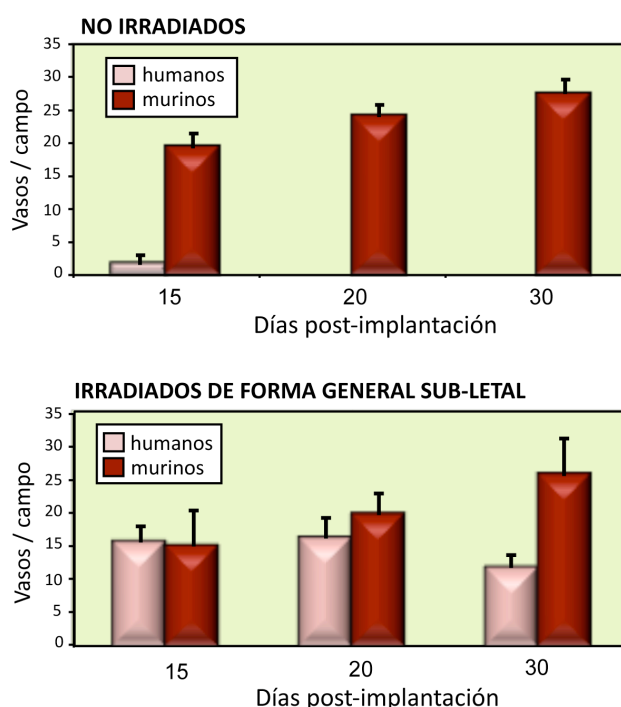


Figura 48: Cuantificación temporal de los cambios en la vasculatura humana y murina de los implantes en ratones irradiados. Los vasos humanos y murinos de los implantes I-TV de ratones control no irradiados y ratones irradiados de forma general subletal fueron cuantificados en 5 campos por sección en un total de 4 secciones por ratón a días 15, 20 y 30. Medias \pm DE representadas.

DISCUSIÓN

1. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES: ¿ALTA COSTURA O *PRÊT-À-PORTER*?

El desarrollo, por Köhler y Milstein en 1975, de la tecnología del hibridoma para obtención de AcMos representó el inicio de una nueva era para la biomedicina. Los AcMos se utilizan con fines diagnósticos y terapéuticos. Su uso en pruebas diagnósticas *in vitro* se remonta al año 1981, mientras que su uso con fines terapéuticos data de 1986. Concretamente, el primer anticuerpo monoclonal aprobado fue el “muromonab”, utilizado para prevenir el rechazo agudo de los trasplantes (Casanova-Estruch, 2011).

La obtención de AcMos (murinos o humanos) mediante la tecnología del hibridoma es un procedimiento individualizado, ineficiente y muy laborioso (*Alta Costura*), que ha experimentado pocos cambios desde su descripción original (Köhler & Milstein, 1975). El procedimiento se inicia con la inmunización de un animal, con el Ag o la mezcla antigénica de interés, empleando pautas de inmunización seriadas y sustancias adyuvantes (Neuberger, 2002; Rudbach *et al*, 1995). Tras la inmunización se obtienen los linfocitos B activados, y se fusionan, con una célula de mieloma deficiente en alguna de las enzimas necesarias para la síntesis de nucleótidos por la vía de rescate. Tras la selección de hibridomas apropiado, se realiza el análisis de los sobrenadantes de cultivo, y se seleccionan aquel o aquellos hibridomas que expresan el AcMo deseado. El último paso del proceso implica la clonación del hibridoma para asegurar su monoclonalidad (Magadán, S & González-Fernández, 2004).

Posteriormente se han desarrollado otros métodos para la obtención de AcMos empleando plataformas de selección *in vitro* de colecciones de genes V humanos (*Prêt-à-Porter*). Estas plataformas de presentación y selección se basan en tres conceptos básicos:

1. preparación de mezclas complejas (repertorios) de moléculas.
2. asociación física entre la proteína (fenotipo) y la información genética que lo codifica (genotipo).
3. diseño de métodos de selección que permitan identificar la unión específica de elementos del “repertorio” creado y el ligando de interés.

Entre ellas cabe destacar las tecnologías de presentación en la superficie de microorganismos como bacteriófagos (Hoogenboom, 2005), levaduras (Boder &

Wittrup, 1997), bacterias (Martineau *et al*, 1998) y retrovirus (Urban *et al*, 2005), así como en la superficie de células de mamífero (Cumbers *et al*, 2002; Zauderer, 2002). Existen otras tecnologías que forman complejos entre el Ac y el DNA (Odegrip *et al*, 2004; Reiersen *et al*, 2005), entre el Ac y el ARNm de forma covalente (Wilson *et al*, 2001) o, recientemente, el *Ribosome Display*, donde el Ac forma complejo con el propio ribosoma (Hanes & Pluckthun, 1997; Mattheakis *et al*, 1994).

Existen varios tipos de repertorios de Acs: repertorios naturales (naif o inmunes), repertorios sintéticos y repertorios semi-sintéticos (Ponsel *et al*, 2011). Los repertorios inmunes son generados a partir de células B de donantes inmunizados; mientras que los repertorios naif se obtienen a partir de donantes no inmunizados; los repertorios sintéticos se basan en el diseño y síntesis de genes *in silico*; y los repertorios semi-sintéticos están compuestos por mezclas de CDRs naturales y sintéticos (Ponsel *et al*, 2011). Las plataformas de presentación y selección de repertorios de Acs *in vitro* poseen algunas ventajas respecto a la tecnología clásica de generación de Acs *in vivo*:

1. la selección puede ser aplicada a una enorme variedad de Ags.
2. las condiciones y la presión selectiva pueden ser adecuadas a los requerimientos de cada Ag.
3. los mecanismos de tolerancia inmunológica no son operativos, por lo que es posible generar Acs frente a proteínas muy conservadas evolutivamente.

La TPPF (*Phage display*) posee numerosas ventajas, comparativamente con otras plataformas de selección de repertorios de Acs. La sencillez y robustez de la plataforma, así como la estabilidad de los fagos han convertido a la TPPF en el “*gold standard*” de los procedimientos de selección de Acs *in vitro*. Esta plataforma permite presentar de forma eficiente Acs con formatos diferentes: Fabs, scFvs y Acs monodominio V_H. Uno de los inconvenientes de la TPPF es la pérdida de clones de alta afinidad durante el proceso de elución. Se ha documentado que debido a la fortaleza de la interacción Ag-Ac, los clones de alta afinidad no son recuperados y no es posible infectar bacterias para expandirlos (Tabla VII). Otro inconveniente es que el tamaño del repertorio está limitado por la eficiencia de transformación bacteriana. Sin embargo, esta limitación se puede solventar realizando un gran número de transformaciones (Vaughan *et al*, 1996), llegando con este procedimiento a obtener repertorios de 10¹² clones.

La TPPF ha sido utilizada *in vitro* para generar Acs frente a Ags purificados y frente a moléculas expresadas en la superficie celular (Molek et al, 2011; Schirrmann *et al*, 2011), sin embargo, en contextos de selección *in vivo*, los bacteriófagos tienen muchas limitaciones debido a sus dificultades para atravesar barreras endoteliales, y a la rápida pérdida de diversidad ocasionada por la neutralización inmune de las partículas virales inoculadas (Palliard, 1998) (Tabla VII).

Tabla VII	Características de las plataformas de presentación de Acs						
	TP ¹						TPA ²
Sistema	Orgánulo subcelular	Virus		Célula procariota	Célula Eucariota		
Plataforma	Ribosome display	Phage display	Retrovirus display	Bacterial display	Yeast display	Mammalian Cell display	Plataforma SALT
Soporte de la plataforma	Ribosoma	Bacteriófago M13	Virus de la Leucemia Murina de Moloney	<i>E.coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>Z. mobili</i>	<i>S. cerevisiae</i>	LB, LT, 293T	LT
Formato Ac	Dab, scFv, Fab	Dab, scFv, Fab	scFv	scFv	Dab, scFv, Fab, IgG	scFv	Dab, scFv
Tamaño	30 nm	1 µm	0,1 µm	0,5-5 µm	10 µm	7-15 µm	7-15 µm
Elución	Sí	Sí	No	No	No	No	No
Diversidad	10 ¹¹ -10 ¹²	10 ⁹ -10 ¹²	10 ⁶ -10 ⁸	10 ⁹ -10 ¹²	10 ⁶ -10 ⁷	10 ⁶ -10 ⁷	10 ⁶ -10 ⁷
Extravasación	No	No	No	No	No	Sí	Sí

TP¹: tecnología de presentación (*display*); TPA²: tecnología de presentación y activación; LB: Linfocitos B; LT: Linfocitos T; 293T: Línea celular de riñón embrionario humano

En la plataforma de presentación y selección basada en retrovirus (TPPR o *Retroviral display*) el tamaño de los repertorios es inferior ($\approx 10^7$ clones) al tamaño estándar de los repertorios empleados en la plataforma basada en bacteriófagos, sin embargo, algunas particularidades de la plataforma, como la omisión del paso de elución y el uso de retrovirus replicativamente competentes puede compensar la pérdida de diversidad clonal. Además de su sencillez metodológica, el uso de células humanas para el rescate (infección) y la producción de las partículas virales, evita los problemas de pérdida de función del Ac, frecuentemente asociados con los cambios de huésped.

Las plataformas basadas en ribosomas (*Ribosome display*) poseen algunas ventajas frente a otras plataformas de presentación y selección: (i) no es necesario realizar ningún tipo de transformación celular, por lo que es posible generar repertorios de mayor diversidad (10^{12}) que con las metodologías previamente descritas, y además su generación es muy sencilla; (ii) la amplificación por PCR puede ser acoplada con procedimientos de mutagénesis aleatoria, permitiendo realizar múltiples rondas de selección en periodos de tiempo muy cortos; y (iii) la adición de EDTA tras la selección permite disociar con gran facilidad el ARNm del ribosoma, sin que ocurra el fenómeno de pérdida de clones de mayor afinidad frecuentemente observado en la TPPF (Tabla VII). Sin embargo, la principal desventaja del *Ribosome display* radica en la inestabilidad del ARNm. Además, la presentación está limitada a proteínas de cadena única, normalmente scFvs.

Las plataformas basadas en bacterias no han tenido gran relevancia para la selección de Acs, debido a problemas derivados de la producción de Acs en un sistema heterólogo (plegamiento y estabilidad), la presentación multivalente y la dificultad de accesibilidad del repertorio. No obstante, a pesar de estos inconvenientes, se han publicado múltiples trabajos en los que se utilizan plataformas bacterianas para la generación de Acs (Daugherty et al, 1999; Chen *et al*, 2001).

Una de las principales ventajas de la plataforma de presentación y selección basada en levaduras (TPPL o *Yeast display*), es la capacidad para exponer moléculas IgG nativas, lo cual es imposible con las plataformas basadas en virus (Ponsel *et al*, 2011). Se ha postulado que una vez identificado un Ac de interés, esta particularidad podría acelerar su aplicabilidad clínica, ya que no sería necesario modificar o reconstituir el Ac seleccionado, proceso muy complicado y laborioso, que puede originar la pérdida de función de la molécula resultante (Cuesta *et al*, 2010). Además, la posibilidad de realizar el proceso de selección mediante citometría separadora, permite trabajar con proteínas en solución, evitando los cambios conformacionales frecuentemente asociados con el proceso de inmovilización. La principal desventaja de esta plataforma, al igual que ocurre con otros sistemas de presentación y selección basados en células eucariotas, es el tamaño del repertorio, que suele estar entre 10^6 - 10^7 clones (Beerli *et al*, 2008) (Tabla VII).

Las plataformas de presentación y selección basadas en células de mamífero, y más concretamente en células humanas, suponen uno de los mayores retos en el campo de

la selección de AcMos debido a las múltiples ventajas que aporta, con respecto a las metodologías descritas anteriormente, en cuanto a expresión, plegamiento y modificaciones post-traduccionales (Wolkowicz *et al*, 2005). Por tanto, son muchos los esfuerzos que se están realizando para desarrollar plataformas de selección basadas en células humanas (Wolkowicz *et al*, 2005; Ho *et al*, 2006; Beerli *et al*, 2008; Taube *et al*, 2008). Sin embargo, estas plataformas son aún metodologías emergentes basadas en la selección de células cuyos Acs de superficie son capaces de unirse a Ags marcados en solución, por lo que se basan en interacciones meramente físicas que requieren múltiples rondas de selección para encontrar un Ac de interés. Una de las mayores desventajas de la exposición de repertorios en células de mamífero, es la incapacidad de manejar repertorios con el elevado número de clones que permiten las plataformas virales.

2. PLATAFORMA SALT: UN GRAN “SALTO” EN LA SELECCIÓN DE REPERTORIOS

En este trabajo se describe el diseño, la construcción y caracterización, *in vitro* e *in vivo*, de una nueva plataforma de presentación y **Selección**, basada en la **Activación** de **Linfocitos T** humanos. En la plataforma SALT, las células T expresan el repertorio de Acs en el contexto de un receptor de Ag quimérico (CAR).

Desde su descripción original en el año 1993, por el grupo del Dr. Zelig Eshhar (Gross *et al*, 1989), se han publicado numerosos trabajos, que han permitido profundizar en el conocimiento de la biología de este tipo de receptores quiméricos, también denominados: receptores inmunes quiméricos (CIR, del inglés *chimeric immune receptor*) y *T-bodies* (Eshhar *et al*, 1993). El concepto de CAR se basa en trabajos que demostraron que proteínas de fusión construidas con cadenas del complejo TCR/CD3 y dominios extracelulares no relacionados, se expresaban de forma estable y funcional en la superficie de células T transfectadas y que tras su interacción con el Ag, transducían señales de activación similares a las observadas tras la interacción fisiológica mediada por el complejo TCR/CD3 (Irving & Weiss, 1991; Romeo & Seed, 1991). Esta interacción, independiente del MHC, dispara la secreción de citoquinas y puede mediar la citólisis de las células diana que expresan el antígeno reconocido por el CAR (Sanz *et al*, 2004).

En este trabajo demostramos que en una línea celular T humana que expresan un CAR con especificidad anti-tumoral (anti-CEA), construido con la porción citoplasmática de la cadena ζ del complejo TCR/CD3, la ocupación del CAR por el ligando específico, expresado en la superficie de una célula tumoral, induce la activación linfocitaria: expresión de marcadores de activación y secreción de citoquinas, a niveles similares a los observados tras la activación con un AcMo anti-CD3 inmovilizado

El paso limitante de mayoría de las plataformas de presentación y selección de repertorios, es el alto porcentaje de clones no específicos resultante (Hoogenboom, 2005). En la plataforma SALT, la interacción entre el Ag y el Ac, presentado en el contexto de un CAR, produce un cambio en la expresión génica de la célula T, lo cual se traduce en un cambio fenotípico que nos permite diferenciar a la células T portadoras de Acs “específicos y efectivos”, de aquellas células T portadoras de Acs que se unen a la diana de forma “no específica o no efectiva” (Figura 49). Empleando mezclas celulares predeterminadas, hemos demostrado que la plataforma SALT permite detectar y seleccionar células T tumor-específicas con un factor de enriquecimiento de al menos 10^3 , tras dos rondas de activación-selección *in vitro*.

Es importante destacar que, a partir de una genoteca de scFvs en formato CAR con una diversidad teórica de 10^5 , y tras tres rondas de selección-activación *in vitro*, hemos seleccionado varios Acs (*CARBodies*) que reconocen Acs expresados en la superficie de una línea celular epitelial humana procedente de un carcinoma de cérvix. Los Acs, en formato scFv, se aislaron en forma activa a partir de extractos periplásmicos de la cepa de *E. coli*, y fueron fácilmente purificados mediante IMAC. Los *CARBodies* purificados demostraron una excelente estabilidad y capacidad de unión al Ag, expresado en la superficie de la célula tumoral.

Varios estudios han examinado la relación entre la cantidad de CAR expresado en superficie y la respuesta celular T (Alvarez-Vallina & Russell, 1999; Turatti *et al*, 2007). En un estudio realizado en el mismo modelo celular y con el mismo tipo de CAR (TCR ζ) se observó que, para una concentración antigénica fija, existe una densidad óptima de CAR que permite obtener la máxima secreción de IL-2 (Alvarez-Vallina & Russell, 1999). Con densidades de CAR bajas se inducen respuestas submáximas y con densidades mayores se induce apoptosis (muerte inducida por activación o AICD, del inglés *Activation Induced Cell Death*). Estos experimentos sugieren que la densidad del CAR podría controlar tanto el reconocimiento de la diana como la supervivencia

celular. En estudios realizados con células T humanas primarias, la expresión de una densidad limitante de CAR impedía la lisis de células que expresaban bajos niveles del Ag diana reconocido por el CAR, pero permitía la lisis eficiente de células que expresaban altas densidades de Ag (Weijtens *et al*, 2000). Recientemente se ha demostrado que los este tipo de recetores se activan y modulan negativamente de la superficie de las células T primarias, en respuesta a la interacción con el Ag expresado en la célula diana, de forma dosis-dependiente (James *et al*, 2008). Por lo tanto al menos tres factores condicionan la actividad de las células T CAR⁺ (James *et al*, 2010) en “ambientes cargados” de Ag (alta densidad antigénica):

1. la modulación del CAR, que limita la lisis o activación celular secuencial.
2. el agotamiento clonal (*clonal exhaustion*).
3. la eliminación clonal (delección) de las células T a través de un proceso de AICD.

Aunque no disponemos de evidencias experimentales, es razonable asumir que tras un periodo de cultivo continuado de la población de células T transducida con el repertorio de Acs en formato CAR, ocurrirá un proceso de eliminación de aquellos clones que presenten CARs autoreactivos: receptores de Ag quiméricos con Acs que son capaces de reconocer Ag expresados en la superficie de la célula presentadora. El resultado final de este proceso de “selección negativa” sería una población que no expresa CAR autoreactivos, o que los expresa a un nivel insuficiente para desencadenar la activación celular T (Figura 49). Este proceso de “selección negativa” es una gran ventaja potencial de la plataforma SALT, respecto a las plataformas convencionales, ya que permitirá reducir el número de Acs “irrelevantes” que reconocen Acs expresados tanto en la célula presentadora del repertorio, como en la célula diana.

Otra de las grandes ventajas de la plataforma SALT es la posibilidad de seleccionar Acs frente a proteínas presentes en la región de contacto (sinapsis) entre la célula tumoral y el linfocito T. Esta habilidad puede permitir generar Acs frente a:

1. proteínas muy difíciles de “manejar” con otras plataformas de presentación y selección, como los receptores asociados a proteína G, que poseen siete dominios transmembrana.

2. epítopos “poco accesibles” situados en regiones próximas a la membrana celular. Estas regiones no son “visibles” a los repertorios presentados en el contexto de plataformas convencionales basadas en partículas virales, bacterias o levaduras; que suelen seleccionar Acs frente a epítopos localizados en regiones expuestas.

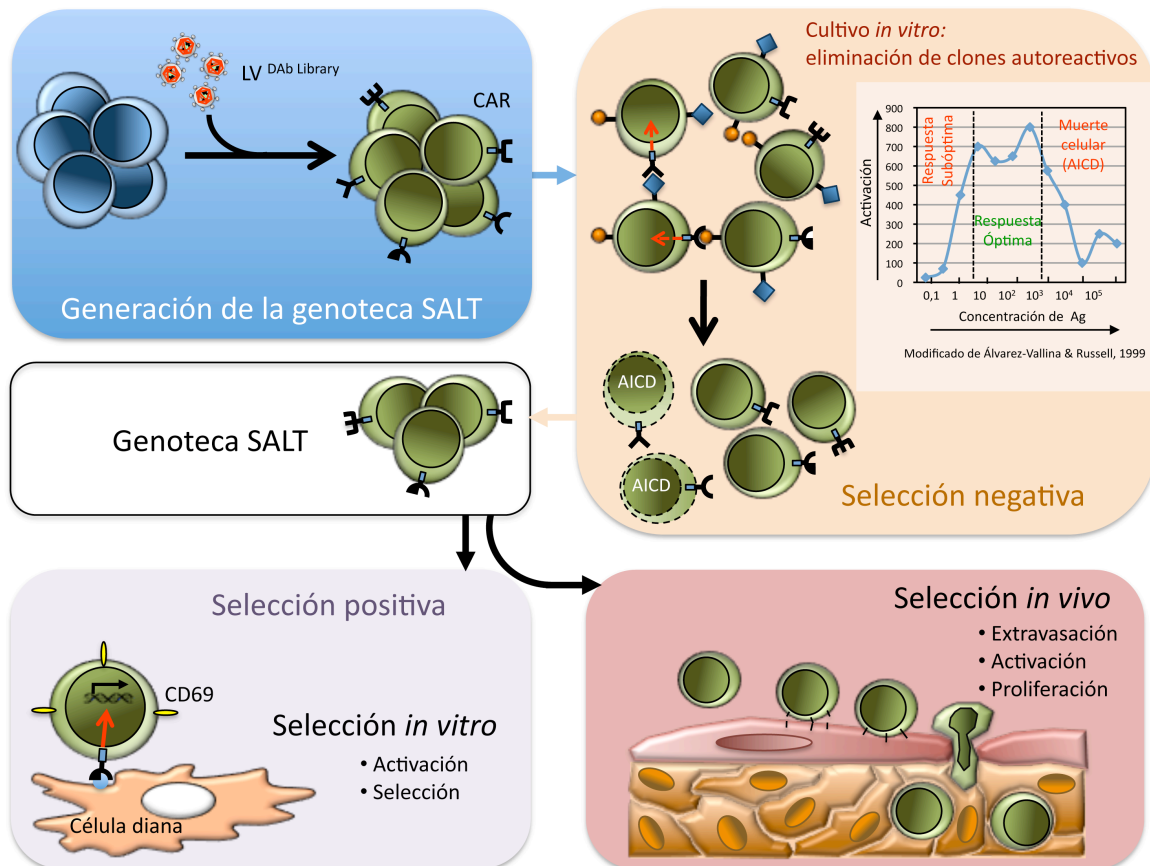


Figura 49: Generación y funcionamiento de la plataforma SALT *in vitro* e *in vivo*. La población de células T es transducida para expresar un repertorio policlonal en formato CARs y el gen marcador de la EGFP (Genoteca SALT). La utilización de un CAR de primera generación (TCR ζ) permitirá la eliminación de clones autorreactivos (“selección negativa”) durante el periodo de expansión *in vitro* de la población, previo al proceso de selección. Esto es debido a un proceso de muerte celular programada (AICD) de aquellos clones cuyo CAR reconoce antígenos de superficie presentes en la población presentadora del repertorio. Durante el proceso de selección *in vitro*, la genoteca SALT se cultiva con la población de células diana. Las células que expresan un CAR específico para alguno de los antígenos de superficie de la célula diana, se activan expresando marcadores como CD69, que permiten la “selección positiva” de los clones de interés. En un contexto *in vivo*, la selección del repertorio va a realizarse como consecuencia de la extravasación, y de la posterior activación y proliferación de los clones de interés.

Otras ventajas de la plataforma SALT son:

1. los Acs son seleccionados directamente en células de mamífero, evitando así los problemas de estabilidad y funcionalidad frecuentemente asociados con el cambio de hospedador, de un sistema procariota a eucariota.

2. El sistema de “selección positiva” asociado al proceso de activación del linfocitaria evita la necesidad de emplear procedimientos de elución, que son responsables de la pérdida de Acs de alta afinidad, durante los procesos de selección con plataforma convencionales.

Así pues aunque este tipo de plataformas no permiten manejar grandes repertorios, un repertorio más pequeño pero optimizado en términos de conformación, accesibilidad y especificidad puede ser más eficiente para generar Acs, que repertorios mucho mayores (Mao *et al*, 2010). Esto podría ser especialmente importante en procesos de selección *in vivo*, donde las células T portadoras del repertorio SALT podrían de recircularizar y migrar a los diferentes compartimentos tisulares, a diferencia de los virus que son muy inmunogénicos y poco eficientes para realizar procesos de extravasación.

Para las selecciones *in vivo* empleando la plataforma SALT empleamos un repertorio de Acs monodominio V_H (Repertorio Dab) en formato CAR de segunda generación capaz de mediar señales de activación y de coestimulación a través de un único segmento extracelular de reconocimiento. Estos CARs incorporan la región de señalización de CD28 en serie con la de la cadena TCR ζ (Finney *et al*, 1998; Maher *et al*, 2002; Kowolik *et al*, 2006; Vera *et al*, 2006). Se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que estos CARs multisegmento incrementan la actividad antitumoral de las células T que los expresan con respecto a los CAR que sólo incorporan la cadena TCR ζ (Finney *et al*, 1998). Además, la incorporación de moléculas coestimuladoras aumenta la supervivencia y proliferación de las células T tras la activación mediada por el CAR (Álvarez-Vallina & Russell, 1999; Álvarez-Vallina *et al*, 2000; Dotti *et al*, 2009; Cartellieri *et al*, 2010; Jena *et al*, 2010). Además el CAR incorpora un espaciador derivado de la región bisagra de la cadena CD8 α , para aportar mayor flexibilidad al CAR. Durante el proceso de selección *in vivo* los periodos de contacto de la célula T con la célula diana pueden ser prolongados, y en este contexto es fundamental garantizar la supervivencia y expansión clonal de las células reactivas. La elección del repertorio Dab se fundamenta en datos previos obtenidos en el laboratorio que demuestran que la selección *in vivo* de repertorios *scFv* en un contexto de bacteriofagos es muy ineficiente, probablemente debido a la degradación del Ac recombinante (Sánchez-Martín. Comunicación personal).

Los estudios *in vivo* realizados en este trabajo son preliminares. La inoculación por vía i.v. de la población T ocasiona la pérdida de una gran parte del repertorio, que va a ser retenido en el sistema microcirculatorio pulmonar. La inoculación por vía i.c. evita el filtro pulmonar y permite al repertorio acceder al territorio arterial. Los leucocitos se acumulan en los sitios de infección e inflamación y parte del tráfico normal de los mismos incluye localizaciones como pulmones, ganglios linfáticos, hígado, bazo y médula ósea, a partir de las cuales vuelven a recircular (Peters, 1998; Qiao *et al*, 2008). Las células utilizadas para la validación *in vivo* de la plataforma no son células T primarias, se trata de una línea celular T humana de origen tumoral (leucemia), que puede presentar un patrón de tráfico anómalo de retención y recirculación especialmente en un sistema murino. Por tanto, tras la inoculación sistémica de una población de células T humanas, la mayoría de las células van a ser filtradas en diversas localizaciones como los pulmones o los ganglios linfáticos, donde pueden ser retenidas de manera permanente, afectando así a la eficacia del proceso de selección. Esto podría explicar los discretos resultados observados en los ensayos de selección *in vivo* tras la inoculación por vía sistémica (i.v. e i.c.). Estos procesos de retención y recircularización no serían un problema para la plataforma SALT en el caso de utilizar células T primarias de origen murino. De esta manera, en modelos de xenotrasplante humano, una plataforma SALT de origen murino optimizada permitiría la selección de células T portadoras de Acs de interés tras un proceso de extravasación mediado por moléculas de adhesión celular, y un proceso de retención y activación celular mediado por el CAR (Figura 49). Una vez realizada la selección, el CAR de interés podría clonarse en linfocitos T humanas para realizar estudios más exhaustivos de terapia adoptiva.

3. SELECCIÓN *IN VIVO* DE ANTICUERPOS: NUEVOS MODELOS ANIMALES

En relación con la selección *in vivo* de Acs, así como en la evaluación de posibles terapias adoptivas con células T, se hace necesaria la generación de modelos animales optimizados, donde tanto el componente tumoral como el vascular sean de origen humano. En este trabajo se demuestra que la co-implantación en ratones inmunodeficientes, de una mezcla de células humanas, tumorales, endoteliales y mesenquimales, permite la formación de xenotransplantes tumorales con redes vasculares humanas funcionales. La presencia de lúmenes vasculares con eritrocitos en

su interior demuestra el potencial vasculogénico de las células humanas endoteliales y mesenquimales, y la formación de anastomosis funcionales con el sistema circulatorio murino.

Recientemente se demostró que la co-implantación en ratones inmunodeficientes, de células endoteliales y mesenquimales humanas, originaba la formación de vasos humanos estables y funcionales durante mas de tres meses (Sanz *et al*, 2008; Melero-Martín *et al*, 2007; Au *et al*, 2008). Sin embargo, la generación de redes vasculares humanas en un contexto tumoral es mucho más complicado, ya que el tumor produce factores proangiogénicos que aceleran el proceso de colonización del tumor por parte de la vasculatura murina (Sanz *et al*, 2009). Con la finalidad de retrasar este proceso de colonización por vasos murinos los ratones fueron irradiados de forma previa a la implantación. La irradiación local produce daños en las células endoteliales (Budach *et al*, 1993; Dimitrievich *et al*, 1984) e inhibe la angiogénesis regional (Shinohara *et al*, 2005; Sholley *et al*, 1984). En trabajos previos se ha sugerido que en tumores inoculados en tejidos preirradiados, la vasculatura neoformada tiene origen vasculogénico (Ahn & Brown, 2008). En nuestro modelo la irradiación local previa a la implantación afectó al crecimiento y a la vascularización de forma muy significativa.

Sin embargo, la irradiación general previa permitió la permanecía de la vasculatura humana intratumoral durante al menos un mes. El descubrimiento de que los precursores endoteliales derivados de la médula ósea podrían participar en la neovascularización (Udagawa *et al*, 2007), sugiere que este tipo de irradiación podría inhibir la colonización vascular murina suprimiendo el reclutamiento de progenitores endoteliales derivados de médula ósea. Los vasos de origen murino se localizan principalmente en la periferia tumoral, mientras que los vasos humanos se distribuyen de forma más homogénea por todo el tumor. La reconstitución hematopoyética espontánea tras la irradiación (Charrier *et al*, 2004), está asociada con la colonización del tumor humano por vasos murinos, observada en este trabajo a día 30 post-implantación de la mezcla celular humana (la recuperación de los valores normales de neutrófilos y plaquetas tras la irradiación ocurre entre los días 28 y 38). Esto sugiere que las células circulantes derivadas de médula ósea juegan un papel fundamental en la vascularización tumoral. En ausencia de colonización por células circulantes, la vasculatura tumoral humana se preserva.

En resumen, en este trabajo hemos desarrollado un modelo de vasculatura tumoral humana en ratones inmunodeficientes, en el que el componente vascular humano

permanece funcional durante un largos periodos de tiempo. Este modelo será de utilidad para estudiar aspectos básicos del proceso de vascularización tumoral, para la evaluación de nuevos fármacos, así como para la identificación de nuevas dianas moleculares asociadas con el proceso de neovascularización. Además la permanencia del componente endotelial humano puede ser monitorizado mediante procedimientos tecnológicos no invasivos como la bioluminiscencia. La adición de otros componentes presentes en el microambiente tumoral (fibroblastos o monocitos), podría permitir la generación de nuevos modelos tumorales mas realistas e incluso más duraderos en el tiempo.

CONCLUSIONES

- I. En una línea celular T humana que expresan un CAR de primera generación, construido con la porción citoplasmática de la cadena ζ del complejo TCR/CD3, la ocupación del CAR por el ligando específico, expresado en la superficie de una célula tumoral, induce la activación linfocitaria: expresión de marcadores de activación y secreción de citoquinas, a niveles similares a los observados tras la activación con un AcMo anti-CD3 inmovilizado.
- II. La activación mediada por la ocupación de un CAR, seguida del aislamiento mediante citometría separadora de las células CD69⁺, permite detectar y seleccionar células T tumor-específicas con un factor de enriquecimiento de al menos 10³, tras dos rondas de activación-selección *in vitro*.
- III. A partir de una genoteca de scFvs en formato CAR de primera generación, con una diversidad teórica de 10⁵ y tras tres rondas de selección-activación *in vitro*, hemos seleccionado varios Acs que reconocen Ags expresados en la superficie de una línea tumoral humana.
- IV. Los Acs seleccionados (*CARbodies*), se aislaron en forma activa a partir de extractos periplásmicos de la cepa de *E. coli*, y fueron fácilmente purificados mediante cromatografía. Los *CARbodies* purificados demostraron una excelente estabilidad y capacidad de unión al Ag, expresado en la superficie de la célula tumoral.
- V. Los Acs seleccionados son funcionalmente activos *in vitro* en el contexto de un CAR de segunda generación, en el que un segmento derivado de la molécula co-estimuladora CD28 se inserta en serie con la cadena TCR ζ .
- VI. Los procesos de selección *in vivo* deben ser optimizados para definir la vía y dosis de administración idóneas, así como el tipo de célula presentadora del repertorio.
- VII. Mediante la irradiación general subletal de ratones inmunodeficientes, animales de manera previa a la implantación subcutánea de xenotransplantes tumorales-vasculares En este trabajo se demuestra que la co-implantación en ratones inmunodeficientes, de una mezcla de células tumorales, endoteliales y

mesenquimales de origen humano, permite la formación de xenotransplantes tumorales con redes vasculares humanas funcionales

VIII. Usando aproximaciones basadas en la irradiación de animales de manera previa a la implantación subcutánea de xenotransplantes tumorales-vasculares, es posible establecer un modelo animal de tumor humano con redes vasculares humanas, cuya evolución puede seguirse a través de un método no invasivo de captación de bioluminiscencia.

IX. Este modelo animal puede resultar de gran utilidad para estudiar mecanismos básicos de proceso angiogénico, así como para seleccionar AcMos in vivo y validar compuestos o sistemas celulares de interés terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, N., Ratnayake, M., Savoldo, B., Perlaky, L., Dotti, G., Wels, W.S., Bhattacharjee, M.B., Gilbertson, R.J., Shine, H.D., Weiss, H.L., Rooney, C.M., Heslop, H.E. & Gottschalk, S., 2007, **Regression of experimental medulloblastoma following transfer of HER2-specific T cells**, *Cancer research*, 67(12), pp. 5957-64.
- Ahn, G.O. & Brown, J.M., 2008, **Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells**, *Cancer cell*, 13(3), pp. 193-205.
- Altman, A., Coggeshall, K.M. & Mustelin, T., 1990, **Molecular events mediating T cell activation**, *Advances in immunology*, 48, pp. 227-360.
- Alvarez-Vallina, L., 2001, **Genetic approaches for antigen-selective cell therapy**, *Current gene therapy*, 1(4), pp. 385-97.
- Alvarez-Vallina, L. & Hawkins, R.E., 1996, **Antigen-specific targeting of CD28-mediated T cell co-stimulation using chimeric single-chain antibody variable fragment-CD28 receptors**, *European journal of immunology*, 26(10), pp. 2304-9.
- Alvarez-Vallina, L. & Russell, S.J., 1999, **Efficient discrimination between different densities of target antigen by tetracycline-regulatable T bodies**, *Human gene therapy*, 10(4), pp. 559-63.
- Alvarez-Vallina, L., Yañez, R., Blanco, B., Gil, M. & Russell, S.J., 2000, **Pharmacologic suppression of target cell recognition by engineered T cells expressing chimeric T-cell receptors**, *Cancer gene therapy*, 7(4), pp. 526-9.
- Au, P., Tam, J., Fukumura, D. & Jain, R.K., 2008, **Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature**, *Blood*, 111(9), pp. 4551-8.
- Bank, I., DePinho, R.A., Brenner, M.B., Cassimeris, J., Alt, F.W. & Chess, L., 1986, **A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes**, *Nature*, 322(6075), pp. 179-81.
- Beerli, R.R., Bauer, M., Buser, R.B., Gwerder, M., Muntwiler, S., Maurer, P., Saudan, P. & Bachmann, M.F., 2008, **Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), pp. 14336-41.
- Berd, D., Maguire, H.C., McCue, P. & Mastrangelo, M.J., 1990, **Treatment of metastatic melanoma with an autologous tumor-cell vaccine: clinical and immunologic results in 64 patients**, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 8(11), pp. 1858-67.
- Berry, L.J., Moeller, M. & Darcy, P.K., 2009, **Adoptive immunotherapy for cancer: the next generation of gene-engineered immune cells**, *Tissue antigens*, 74(4), pp. 277-89.
- Blanco, B., Holliger, P. & Alvarez-Vallina, L., 2002, **Autocrine costimulation: tumor-specific CD28-mediated costimulation of T cells by in situ production of a bifunctional B7-anti-CEA diabody fusion protein**, *Cancer gene therapy*, 9(3), pp. 275-81.
- Bluemel, C., Hausmann, S., Fluhr, P., Sriskandarajah, M., Stallcup, W.B., Baeuerle, P.A. & Kufer, P., 2010, **Epitope distance to the target cell membrane and antigen size determine the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a large**

melanoma surface antigen, *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 59(8), pp. 1197-209.

Boder, E.T. & Wittrup, K.D., 1997, **Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries**, *Nature biotechnology*, 15(6), pp. 553-7.

Boulianne, G.L., Hozumi, N. & Shulman, M.J., 1984, **Production of functional chimaeric mouse/human antibody**, *Nature*, 312(5995), pp. 643-6.

Braciale, T.J., Morrison, L.A., Sweetser, M.T., Sambrook, J., Gething, M.J. & Braciale, V.L., 1987, **Antigen presentation pathways to class I and class II MHC-restricted T lymphocytes**, *Immunological reviews*, 98, pp. 95-114.

Brekke, O.H. & Sandlie, I., 2003, **Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century**, *Nature reviews. Drug discovery*, 2(1), pp. 52-62.

Brenner D., Krammer P.H., Arnold R., 2008, **Concepts of activated T cell death**. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Apr;66(1):52-64.

Brenner, M.B., McLean, J., Dialynas, D.P., Strominger, J.L., Smith, J.A., Owen, F.L., Seidman, J.G., Ip, S., Rosen, F. & Krangel, M.S., 1986, **Identification of a putative second T-cell receptor**, *Nature*, 322(6075), pp. 145-9.

Brentjens, R., Yeh, R., Bernal, Y., Riviere, I. & Sadelain, M., 2010, **Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial**, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(4), pp. 666-8.

Brown, J.H., Jardetzky, T., Saper, M.A., Samraoui, B., Bjorkman, P.J. & Wiley, D.C., 1988, **A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules**, *Nature*, 332(6167), pp. 845-50.

Brüggemann, M. & Neuberger, M.S., 1996, **Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice**, *Immunology today*, 17(8), pp. 391-7.

Buchholz, C.J., Peng, K.W., Morling, F.J., Zhang, J., Cosset, F.L. & Russell, S.J., 1998, **In vivo selection of protease cleavage sites from retrovirus display libraries**, *Nature biotechnology*, 16(10), pp. 951-4.

Budach, W., Taghian, A., Freeman, J., Gioioso, D. & Suit, H.D., 1993, **Impact of stromal sensitivity on radiation response of tumors**, *Journal of the National Cancer Institute*, 85(12), pp. 988-93.

Burgdorf S., Kurts C., 2008, **Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation**. *Curren Opinion in Immunology* 2008, 20:89-95.

Cartellieri, M., Bachmann, M., Feldmann, A., Bippes, C., Stamova, S., Wehner, R., Temme, A. & Schmitz, M., 2010, **Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer**, *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, p. 956304.

Casanova Estruch B., 2011, **Safety profile and practical considerations of monoclonal antibody treatment**, *Neurologia*. May 16. Publicado online.

- Chapman, A.P., Antoniwi, P., Spitali, M., West, S., Stephens, S. & King, D.J., 1999, **Therapeutic antibody fragments with prolonged *in vivo* half-lives**, *Nature biotechnology*, 17(8), pp. 780-3.
- Charrier, S., Michaud, A., Badaoui, S., Giroux, S., Ezan, E., Sainteny, F., Corvol, P. & Vainchenker, W., 2004, **Inhibition of angiotensin I-converting enzyme induces radioprotection by preserving murine hematopoietic short-term reconstituting cells**, *Blood*, 104(4), pp. 978-85.
- Chen, G., Hayhurst, A., Thomas, J.G., Harvey, B.R., Iverson, B.L. & Georgiou, G., 2001, **Isolation of high-affinity ligand-binding proteins by periplasmic expression with cytometric screening (PECS)**, *Nature biotechnology*, 19(6), pp. 537-42.
- Chervin, A.S., Aggen, D.H., Raseman, J.M. & Kranz, D.M., 2008, **Engineering higher affinity T cell receptors using a T cell display system**, *Journal of immunological methods*, 339(2), pp. 175-84.
- Chester, K.A., Begent, R.H., Robson, L., Keep, P., Pedley, R.B., Boden, J.A., Boxer, G., Green, A., Winter, G. & Cochet, O., 1994, **Phage libraries for generation of clinically useful antibodies**, *Lancet*, 343(8895), pp. 455-6.
- Chinnasamy, D., Yu, Z., Theoret, M.R., Zhao, Y., Shrimali, R.K., Morgan, R.A., Feldman, S.A., Restifo, N.P. & Rosenberg, S.A., 2010, **Gene therapy using genetically modified lymphocytes targeting VEGFR-2 inhibits the growth of vascularized syngenic tumors in mice**, *The Journal of clinical investigation*, 120(11), pp. 3953-68.
- Christ, D., Famm, K. & Winter, G., 2006, **Tapping diversity lost in transformations--*in vitro* amplification of ligation reactions**, *Nucleic acids research*, 34(16), p. e108.
- Christ, D., Famm, K. & Winter, G., 2007, **Repertoires of aggregation-resistant human antibody domains**, *Protein engineering, design & selection : PEDS*, 20(8), pp. 413-6.
- Cooper, L.J., Topp, M.S., Serrano, L.M., Gonzalez, S., Chang, W.C., Naranjo, A., Wright, C., Popplewell, L., Raubitschek, A., Forman, S.J. & Jensen, M.C., 2003, **T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect**, *Blood*, 101(4), pp. 1637-44.
- Cuesta, A.M., Sainz-Pastor, N., Bonet, J., Oliva, B. & Alvarez-Vallina, L., 2010, **Multivalent antibodies: when design surpasses evolution**, *Trends in biotechnology*, 28(7), pp. 355-62.
- Cumbers, S.J., Williams, G.T., Davies, S.L., Grenfell, R.L., Takeda, S., Batista, F.D., Sale, J.E. & Neuberger, M.S., 2002, **Generation and iterative affinity maturation of antibodies *in vitro* using hypermutating B-cell lines**, *Nature biotechnology*, 20(11), pp. 1129-34.
- Daugherty, P.S., Olsen, M.J., Iverson, B.L. & Georgiou, G., 1999, **Development of an optimized expression system for the screening of antibody libraries displayed on the *Escherichia coli* surface**, *Protein engineering*, 12(7), pp. 613-21.
- Dimitrievich, G.S., Fischer-Dzoga, K. & Griem, M.L., 1984, **Radiosensitivity of vascular tissue. I. Differential radiosensitivity of capillaries: a quantitative *in vivo* study**, *Radiation research*, 99(3), pp. 511-35.

Dotti, G., Savoldo, B. & Brenner, M., 2009, **Fifteen years of gene therapy based on chimeric antigen receptors: "are we nearly there yet?"**, *Human gene therapy*, 20(11), pp. 1229-39.

Doyle, C. & Strominger, J.L., 1987, **Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion**, *Nature*, 330(6145), pp. 256-9.

Edelman, G.M., 1991, **Antibody structure and molecular immunology**, *Scandinavian journal of immunology*, 34(1), pp. 1-22.

Edelman, G.M., 1959, **Dissociation of gamma-globulin**, *Journal of the American Chemical Society*, 81, pp. 3155-6.

Elinav, E., Adam, N., Waks, T. & Eshhar, Z., 2009, **Amelioration of colitis by genetically engineered murine regulatory T cells redirected by antigen-specific chimeric receptor**, *Gastroenterology*, 136(5), pp. 1721-31.

Elinav, E., Waks, T. & Eshhar, Z., 2008, **Redirection of regulatory T cells with predetermined specificity for the treatment of experimental colitis in mice**, *Gastroenterology*, 134(7), pp. 2014-24.

Ertl, H.C., Zaia, J., Rosenberg, S.A., June, C.H., Dotti, G., Kahn, J., Cooper, L.J., Corrigan-Curay, J. & Strome, S.E., 2011, **Considerations for the Clinical Application of Chimeric Antigen Receptor T Cells: Observations from a Recombinant DNA Advisory Committee Symposium Held June 15, 2010**, *Cancer research*, 71(9), pp. 3175-81.

Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G. & Schindler, D.G., 1993, **Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(2), pp. 720-4.

Fagraeus, A., 1948, **Antibody production in relation to the development of plasma cells**. *Stockholm University*, .

Fathman, C.G. & Frelinger, J.G., 1983, **T-lymphocyte clones**, *Annual review of immunology*, 1, pp. 633-55.

Finney, H.M., Akbar, A.N. & Lawson, A.D., 2004, **Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain**, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(1), pp. 104-13.

Finney, H.M., Lawson, A.D., Bebbington, C.R. & Weir, A.N., 1998, **Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product**, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(6), pp. 2791-7.

Fritsch, P., Wolff, K. & Hönigsmann, H., 1975, **Glycocalyx of epidermal cells *in vitro*: demonstration and enzymatic removal**, *The Journal of investigative dermatology*, 64(1), pp. 30-7.

Gao, L. & Lipowsky, H.H., 2010, **Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its thickness and diffusion of small solutes**, *Microvascular research*, 80(3), pp. 394-401.

- Gorman, S.D. & Clark, M.R., 1990, **Humanisation of monoclonal antibodies for therapy**, *Seminars in immunology*, 2(6), pp. 457-66.
- Greenfield E.A., Nguyen K.A., Kuchroo V.K., 1998, **CD28/B7 costimulation: a review**. *Critical Reviews in Immunology*. 1998;18(5):389-418.
- Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M. & Allison, T.J., 1994, **Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires**, *The EMBO journal*, 13(14), pp. 3245-60.
- Gross, G., Waks, T. & Eshhar, Z., 1989, **Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(24), pp. 10024-8.
- Guest, R.D., Hawkins, R.E., Kirillova, N., Cheadle, E.J., Arnold, J., O' Neill, A., Irlam, J., Chester, K.A., Kemshead, J.T., Shaw, D.M., Embleton, M.J., Stern, P.L. & Gilham, D.E., 2005, **The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens**, *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 28(3), pp. 203-11.
- Güssow, D. & Seemann, G., 1991, **Humanization of monoclonal antibodies**, *Methods in enzymology*, 203, pp. 99-121.
- de Haard, H.J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S.E., Roovers, R.C., Henderikx, P., de Bruïne, A.P., Arends, J.W. & Hoogenboom, H.R., 1999, **A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies**, *The Journal of biological chemistry*, 274(26), pp. 18218-30.
- Hanes, J. & Plückthun, A., 1997, **In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), pp. 4937-42.
- Hefta, L.J., Chen, F.S., Ronk, M., Sauter, S.L., Sarin, V., Oikawa, S., Nakazato, H., Hefta, S. & Shively, J.E., 1992, **Expression of carcinoembryonic antigen and its predicted immunoglobulin-like domains in HeLa cells for epitope analysis**, *Cancer research*, 52(20), pp. 5647-55.
- Ho, M., Nagata, S. & Pastan, I., 2006, **Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), pp. 9637-42.
- Hombach, A., Heuser, C., Sircar, R., Tillmann, T., Diehl, V., Pohl, C. & Abken, H., 1999, **Characterization of a chimeric T-cell receptor with specificity for the Hodgkin' s lymphoma-associated CD30 antigen**, *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 22(6), pp. 473-80.
- Hombach, A.A., Kofler, D., Rappl, G. & Abken, H., 2009, **Redirecting human CD4+CD25+ regulatory T cells from the peripheral blood with pre-defined target specificity**, *Gene therapy*, 16(9), pp. 1088-96.
- Hoogenboom, H.R., 2005, **Selecting and screening recombinant antibody libraries**, *Nature biotechnology*, 23(9), pp. 1105-16.

Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P. & Winter, G., 1991, **Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains**, *Nucleic acids research*, 19(15), pp. 4133-7.

Hoogenboom, H.R., Marks, J.D., Griffiths, A.D. & Winter, G., 1992, **Building antibodies from their genes**, *Immunological reviews*, 130, pp. 41-68.

Hozumi, N. & Tonegawa, S., 2004, **Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. 1976 [classical article]**, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(7), pp. 4260-4.

Huse, W.D., Sastry, L., Iverson, S.A., Kang, A.S., Alting-Mees, M., Burton, D.R., Benkovic, S.J. & Lerner, R.A., 1989, **Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda**, *Science*, 246(4935), pp. 1275-81.

Imai, C., Mihara, K., Andreansky, M., Nicholson, I.C., Pui, C.H., Geiger, T.L. & Campana, D., 2004, **Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia**, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 18(4), pp. 676-84.

Irving, B.A. & Weiss, A., 1991, **The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways**, *Cell*, 64(5), pp. 891-901.

James, S.E., Greenberg, P.D., Jensen, M.C., Lin, Y., Wang, J., Budde, L.E., Till, B.G., Raubitschek, A.A., Forman, S.J. & Press, O.W., 2010, **Mathematical modeling of chimeric TCR triggering predicts the magnitude of target lysis and its impairment by TCR downmodulation**, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(8), pp. 4284-94.

James, S.E., Greenberg, P.D., Jensen, M.C., Lin, Y., Wang, J., Till, B.G., Raubitschek, A.A., Forman, S.J. & Press, O.W., 2008, **Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric TCR is modulated by target epitope distance from the cell membrane**, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(10), pp. 7028-38.

Jena, B., Dotti, G. & Cooper, L.J., 2010, **Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor**, *Blood*, 116(7), pp. 1035-44.

Jensen, M.C., Cooper, L.J., Wu, A.M., Forman, S.J. & Raubitschek, A., 2003, **Engineered CD20-specific primary human cytotoxic T lymphocytes for targeting B-cell malignancy**, *Cytotherapy*, 5(2), pp. 131-8.

Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S. & Winter, G., 1986, **Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse**, *Nature*, 321(6069), pp. 522-5.

Kabelitz D., Wesch D., He W., 2007, **Perspectives of $\gamma\delta$ T Cells in Tumor Immunology**. *Cancer Research* 67: (1). January 1, 2007

Kershaw, M.H., Westwood, J.A., Parker, L.L., Wang, G., Eshhar, Z., Mavroukakis, S.A., White, D.E., Wunderlich, J.R., Canevari, S., Rogers-Freezer, L., Chen, C.C., Yang, J.C., Rosenberg, S.A. & Hwu, P., 2006, **A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer**, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(20 Pt 1), pp. 6106-15.

- Kessels, H.W., van Den Boom, M.D., Spits, H., Hooijberg, E. & Schumacher, T.N., 2000, **Changing T cell specificity by retroviral T cell receptor display**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), pp. 14578-83.
- Khare, P.D., Rosales, A.G., Bailey, K.R., Russell, S.J. & Federspiel, M.J., 2003, **Epitope selection from an uncensored peptide library displayed on avian leukosis virus**, *Virology*, 315(2), pp. 313-21.
- Kim, S.J., Park, Y. & Hong, H.J., 2005, **Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies**, *Molecules and cells*, 20(1), pp. 17-29.
- Klee, G.G., 2000, Human anti-mouse antibodies, *Archives of pathology & laboratory medicine*, 124(6), pp. 921-3.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A. & Virnekäs, B., 2000, **Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides**, *Journal of molecular biology*, 296(1), pp. 57-86.
- Koike, N., Fukumura, D., Gralla, O., Au, P., Schechner, J.S. & Jain, R.K., 2004, **Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels**, *Nature*, 428(6979), pp. 138-9.
- Kowolik, C.M., Topp, M.S., Gonzalez, S., Pfeiffer, T., Olivares, S., Gonzalez, N., Smith, D.D., Forman, S.J., Jensen, M.C. & Cooper, L.J., 2006, **CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances *in vivo* persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells**, *Cancer research*, 66(22), pp. 10995-1004.
- Köhler, G. & Milstein, C., 1975, **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity**, *Nature*, 256(5517), pp. 495-7.
- Krammer P.H., Arnold R., Lavrik I.N., 2007, **Life and death in peripheral T cells**. *Nature Reviews Immunology*. Jul;7(7):532-42.
- Lamers, C.H., Sleijfer, S., Vulto, A.G., Kruit, W.H., Kliffen, M., Debets, R., Gratama, J.W., Stoter, G. & Oosterwijk, E., 2006, **Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience**, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(13), pp. e20-2.
- Landsteiner, K., 1945, *Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts*, .
- Lee, C.M., Iorno, N., Sierro, F. & Christ, D., 2007, **Selection of human antibody fragments by phage display**, *Nature protocols*, 2(11), pp. 3001-8.
- Lee, L.S., Conover, C., Shi, C., Whitlow, M. & Filpula, D., 1999, **Prolonged circulating lives of single-chain Fv proteins conjugated with polyethylene glycol: a comparison of conjugation chemistries and compounds**, *Bioconjugate chemistry*, 10(6), pp. 973-81.
- Magadán, S., González-Fernández A. **Generación de anticuerpos monoclonales *in vivo***. En "**Anticuerpos Monoclonales. Realidades y Perspectivas**" (2004) Editorial Complutense, Madrid, .
- Maher, J., Brentjens, R.J., Gunset, G., Rivière, I. & Sadelain, M., 2002, **Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor**, *Nature biotechnology*, 20(1), pp. 70-5.

Mao, H., Graziano, J.J., Chase, T.M., Bentley, C.A., Bazirgan, O.A., Reddy, N.P., Song, B.D. & Smider, V.V., 2010, **Spatially addressed combinatorial protein libraries for recombinant antibody discovery and optimization**, *Nature biotechnology*, 28(11), pp. 1195-202.

Martineau, P., Jones, P. & Winter, G., 1998, **Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm**, *Journal of molecular biology*, 280(1), pp. 117-27.

Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. & Dower, W.J., 1994, **An *in vitro* polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), pp. 9022-6.

Melero-Martin, J.M., Khan, Z.A., Picard, A., Wu, X., Paruchuri, S. & Bischoff, J., 2007, ***In vivo* vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells**, *Blood*, 109(11), pp. 4761-8.

van der Merwe P.A., Dushek O., 2011, **Mechanisms for T cell receptor triggering**. *Nature Reviews Immunology*. 2011 Jan;11(1):47-55. Epub 2010 Dec 3.

Milone, M.C., Fish, J.D., Carpenito, C., Carroll, R.G., Binder, G.K., Teachey, D., Samanta, M., Lakhal, M., Gloss, B., Danet-Desnoyers, G., Campana, D., Riley, J.L., Grupp, S.A. & June, C.H., 2009, **Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo***, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(8), pp. 1453-64.

Mitsuyasu, R.T., Anton, P.A., Deeks, S.G., Scadden, D.T., Connick, E., Downs, M.T., Bakker, A., Roberts, M.R., June, C.H., Jalali, S., Lin, A.A., Pennathur-Das, R. & Hege, K.M., 2000, **Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects**, *Blood*, 96(3), pp. 785-93.

Molek, P., Strukelj, B. & Bratkovic, T., 2011, **Peptide phage display as a tool for drug discovery: targeting membrane receptors**, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(1), pp. 857-87.

Monaco, J.J., 1992, **A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing**, *Immunology today*, 13(5), pp. 173-9.

Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Yang, J.C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Restifo, N.P., Zheng, Z., Nahvi, A., de Vries, C.R., Rogers-Freezer, L.J., Mavroukakis, S.A. & Rosenberg, S.A., 2006, **Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes**, *Science (New York, N.Y.)*, 314(5796), pp. 126-9.

Morgan, R.A., Yang, J.C., Kitano, M., Dudley, M.E., Laurencot, C.M. & Rosenberg, S.A., 2010, **Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2**, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(4), pp. 843-51.

Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A. & Oi, V.T., 1984, **Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(21), pp. 6851-5.

- Müller, D., Karle, A., Meissburger, B., Höfig, I., Stork, R. & Kontermann, R.E., 2007, **Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin**, *The Journal of biological chemistry*, 282(17), pp. 12650-60.
- Naldini, L., Blömer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M. & Trono, D., 1996, **In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector**, *Science*, 272(5259), pp. 263-7.
- Neefjes, J.J. & Ploegh, H.L., 1992, **Intracellular transport of MHC class II molecules**, *Immunology today*, 13(5), pp. 179-84.
- Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Husimi, Y. & Yanagawa, H., 1997, **In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3' -terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro**, *FEBS letters*, 414(2), pp. 405-8.
- Neuberger, M.S., 2002, **Novartis Medal Lecture. Antibodies: a paradigm for the evolution of molecular recognition**, *Biochemical Society transactions*, 30(4), pp. 341-50.
- Nissim, A., Hoogenboom, H.R., Tomlinson, I.M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D. & Winter, G., 1994, **Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents**, *The EMBO journal*, 13(3), pp. 692-8.
- Norment, A.M., Salter, R.D., Parham, P., Engelhard, V.H. & Littman, D.R., 1988, **Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules**, *Nature*, 336(6194), pp. 79-81.
- Odegrip, R., Coomber, D., Eldridge, B., Hederer, R., Kuhlman, P.A., Ullman, C., FitzGerald, K. & McGregor, D., 2004, **CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), pp. 2806-10.
- Orlandi, R., Güssow, D.H., Jones, P.T. & Winter, G., 1989, **Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(10), pp. 3833-7.
- Paillard, F., 1998, **Bacteriophage: tools toward a cell-targeted delivery**, *Human gene therapy*, 9(16), pp. 2307-8.
- Park, J.R., Digiusto, D.L., Slovak, M., Wright, C., Naranjo, A., Wagner, J., Meechoovet, H.B., Bautista, C., Chang, W.C., Ostberg, J.R. & Jensen, M.C., 2007, **Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma**, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(4), pp. 825-33.
- Peters, A.M., 1998, **Nuclear medicine imaging in infection and inflammation**, *Journal of the Royal College of Physicians of London*, 32(6), pp. 512-9.
- Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B., Zardi, L., Neri, P. & Neri, D., 1998, **Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel**, *The Journal of biological chemistry*, 273(34), pp. 21769-76.
- Pizzato, M., Marlow, S.A., Blair, E.D. & Takeuchi, Y., 1999, **Initial binding of murine leukemia virus particles to cells does not require specific Env-receptor interaction**, *Journal of virology*, 73(10), pp. 8599-611.

Ponsel, D., Neugebauer, J., Ladetzki-Bach, K. & Tissot, K., 2011, **High affinity, developability and functional size: the holy grail of combinatorial antibody library generation**, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(5), pp. 3675-700.

Porter, RR, 1959, **The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain**, *Biochemistry Journal*, 73, pp. 119-26.

Pulè, M.A., Straathof, K.C., Dotti, G., Heslop, H.E., Rooney, C.M. & Brenner, M.K., 2005, **A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells**, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 12(5), pp. 933-41.

Qiao, J., Kottke, T., Willmon, C., Galivo, F., Wongthida, P., Diaz, R.M., Thompson, J., Ryno, P., Barber, G.N., Chester, J., Selby, P., Harrington, K., Melcher, A. & Vile, R.G., 2008, **Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy and immunotherapy**, *Nature medicine*, 14(1), pp. 37-44.

Reiche, N., Jung, A., Brabletz, T., Vater, T., Kirchner, T. & Faller, G., 2002, **Generation and characterization of human monoclonal scFv antibodies against Helicobacter pylori antigens**, *Infection and immunity*, 70(8), pp. 4158-64.

Reiersen, H., Løbersli, I., Løset, G.A., Hvattum, E., Simonsen, B., Stacy, J.E., McGregor, D., Fitzgerald, K., Welschof, M., Brekke, O.H. & Marvik, O.J., 2005, **Covalent antibody display--an *in vitro* antibody-DNA library selection system**, *Nucleic acids research*, 33(1), p. e10.

Reiniš M., 2010, **Immunotherapy of MHC class I-deficient tumors**. *Future Oncology*. Oct;6(10):1577-89.

Reth, M., Imanishi-Kari, T. & Rajewsky, K., 1979, **Analysis of the repertoire of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP) antibodies in C 57 BL/6 mice by cell fusion. II. Characterization of idiotopes by monoclonal anti-idiotope antibodies**, *European journal of immunology*, 9(12), pp. 1004-13.

Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. & Winter, G., 1988, **Reshaping human antibodies for therapy**, *Nature*, 332(6162), pp. 323-7.

Roberts, M.R., Qin, L., Zhang, D., Smith, D.H., Tran, A.C., Dull, T.J., Groopman, J.E., Capon, D.J., Byrn, R.A. & Finer, M.H., 1994, **Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8⁺ T lymphocytes armed with universal T-cell receptors**, *Blood*, 84(9), pp. 2878-89.

Roberts, R.W. & Szostak, J.W., 1997, **RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and proteins**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23), pp. 12297-302.

Rojas, G., Vispo, N.S. y Gavilondo, J.V. **Tecnología de bibliotecas combinatorias de fagos filamentosos para producir anticuerpos humanos *in vitro***. En "Anticuerpos Monoclonales. Realidades y Perspectivas" (2004) Editorial Complutense, Madrid.

Romeo, C. & Seed, B., 1991, **Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides**, *Cell*, 64(5), pp. 1037-46.

Rosenberg, S.A., 2004, **Shedding light on immunotherapy for cancer**, *The New England journal of medicine*, 350(14), pp. 1461-3.

Rudbach, J.A., Cantrell, J.L. & Ulrich, J.T., 1995, **Methods of immunization to enhance the immune response to specific antigens *in vivo* in preparation for fusions yielding monoclonal antibodies**, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 45, pp. 1-8.

Russell, S.J., Hawkins, R.E. & Winter, G., 1993, **Retroviral vectors displaying functional antibody fragments**, *Nucleic acids research*, 21(5), pp. 1081-5.

Sadelain, M., Brentjens, R. & Rivière, I., 2009, **The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors**, *Current opinion in immunology*, 21(2), pp. 215-23.

Sadelain, M., Rivière, I. & Brentjens, R., 2003, **Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes**, *Nature reviews. Cancer*, 3(1), pp. 35-45.

Sambrook, J. and Russell, D. W., 2006, **The condensed protocols from Molecular cloning: a laboratory manual**, 2 Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sancho, D., Gómez, M. & Sánchez-Madrid, F., 2005, **CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation**, *Trends in immunology*, 26(3), pp. 136-40.

Sanz, L., Blanco, B. & Alvarez-Vallina, L., 2004, **Antibodies and gene therapy: teaching old 'magic bullets' new tricks**, *Trends in immunology*, 25(2), pp. 85-91.

Sanz, L., Cuesta, A.M., Salas, C., Corbacho, C., Bellas, C. & Alvarez-Vallina, L., 2009, **Differential transplantability of human endothelial cells in colorectal cancer and renal cell carcinoma primary xenografts**, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 89(1), pp. 91-7.

Sanz, L., Kristensen, P., Blanco, B., Facticeau, S., Russell, S.J., Winter, G. & Alvarez-Vallina, L., 2002, **Single-chain antibody-based gene therapy: inhibition of tumor growth by *in situ* production of phage-derived human antibody fragments blocking functionally active sites of cell-associated matrices**, *Gene therapy*, 9(15), pp. 1049-53.

Sanz, L., Santos-Valle, P., Alonso-Camino, V., Salas, C., Serrano, A., Vicario, J.L., Cuesta, A.M., Compte, M., Sánchez-Martín, D. & Alvarez-Vallina, L., 2008, **Long-term *in vivo* imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels**, *Microvascular research*, 75(3), pp. 308-14.

Schaffitzel, C., Hanes, J., Jermutus, L. & Plückthun, A., 1999, **Ribosome display: an *in vitro* method for selection and evolution of antibodies from libraries**, *Journal of immunological methods*, 231(1-2), pp. 119-35.

Schirrmann, T., Meyer, T., Schütte, M., Frenzel, A. & Hust, M., 2011, **Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy**, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(1), pp. 412-26.

Schwartz, R.H., 1985, **T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex**, *Annual review of immunology*, 3, pp. 237-61.

Shinohara, E.T., Geng, L., Tan, J., Chen, H., Shir, Y., Edwards, E., Halbrook, J., Kesicki, E.A., Kashishian, A. & Hallahan, D.E., 2005, **DNA-dependent protein kinase is a molecular target for the development of noncytotoxic radiation-sensitizing drugs**, *Cancer research*, 65(12), pp. 4987-92.

Sholley, M.M., Ferguson, G.P., Seibel, H.R., Montour, J.L. & Wilson, J.D., 1984, **Mechanisms of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells**, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 51(6), pp. 624-34.

Smith, G.P., 1985, **Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface**, *Science*, 228(4705), pp. 1315-7.

Smith, K.A., Nelson, P.N., Warren, P., Astley, S.J., Murray, P.G. & Greenman, J., 2004, **Demystified...recombinant antibodies**, *Journal of clinical pathology*, 57(9), pp. 912-7.

Söderlind, E., Strandberg, L., Jirholt, P., Kobayashi, N., Alexeiva, V., Aberg, A.M., Nilsson, A., Jansson, B., Ohlin, M., Wingren, C., Danielsson, L., Carlsson, R. & Borrebaeck, C.A., 2000, **Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries**, *Nature biotechnology*, 18(8), pp. 852-6.

Specthrie, L., Bullitt, E., Horiuchi, K., Model, P., Russel, M. & Makowski, L., 1992, **Construction of a microphage variant of filamentous bacteriophage**, *Journal of molecular biology*, 228(3), pp. 720-4.

Tan, P., Mitchell, D.A., Buss, T.N., Holmes, M.A., Anasetti, C. & Foote, J., 2002, **"Superhumanized" antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity-determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28**, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(2), pp. 1119-25.

Taube, R., Zhu, Q., Xu, C., Diaz-Griffero, F., Sui, J., Kamau, E., Dwyer, M., Aird, D. & Marasco, W.A., 2008, **Lentivirus display: stable expression of human antibodies on the surface of human cells and virus particles**, *PloS one*, 3(9), p. e3181.

Till, B.G., Jensen, M.C., Wang, J., Chen, E.Y., Wood, B.L., Greisman, H.A., Qian, X., James, S.E., Raubitschek, A., Forman, S.J., Gopal, A.K., Pagel, J.M., Lindgren, C.G., Greenberg, P.D., Riddell, S.R. & Press, O.W., 2008, **Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells**, *Blood*, 112(6), pp. 2261-71.

Turatti, F., Figini, M., Balladore, E., Alberti, P., Casalini, P., Marks, J.D., Canevari, S. & Mezzanzanica, D., 2007, **Redirected activity of human antitumor chimeric immune receptors is governed by antigen and receptor expression levels and affinity of interaction**, *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 30(7), pp. 684-93.

Udagawa, T., Birsner, A.E., Wood, M. & D' Amato, R.J., 2007, **Chronic suppression of angiogenesis following radiation exposure is independent of hematopoietic reconstitution**, *Cancer research*, 67(5), pp. 2040-5.

Urban, J.H., Schneider, R.M., Compete, M., Finger, C., Cichutek, K., Alvarez-Vallina, L. & Buchholz, C.J., 2005, **Selection of functional human antibodies from retroviral display libraries**, *Nucleic acids research*, 33(4), p. e35.

Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hodits, R.A., Wilton, J. & Johnson, K.S., 1996, **Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library**, *Nature biotechnology*, 14(3), pp. 309-14.

Vera, J., Savoldo, B., Vigouroux, S., Biagi, E., Pule, M., Rossig, C., Wu, J., Heslop, H.E., Rooney, C.M., Brenner, M.K. & Dotti, G., 2006, **T lymphocytes redirected against the kappa light chain of human immunoglobulin efficiently kill mature B lymphocyte-derived malignant cells**, *Blood*, 108(12), pp. 3890-7.

Walker, R.E., Bechtel, C.M., Natarajan, V., Baseler, M., Hege, K.M., Metcalf, J.A., Stevens, R., Hazen, A., Blaese, R.M., Chen, C.C., Leitman, S.F., Palensky, J., Wittes, J., Davey, R.T., Falloon, J., Polis, M.A., Kovacs, J.A., Broad, D.F., Levine, B.L., Roberts, M.R., Masur, H. & Lane, H.C., 2000, **Long-term *in vivo* survival of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection**, *Blood*, 96(2), pp. 467-74.

Ward, E.S., Güssow, D., Griffiths, A.D., Jones, P.T. & Winter, G., 1989, **Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli***, *Nature*, 341(6242), pp. 544-6.

Weijtens, M.E., Hart, E.H. & Bolhuis, R.L., 2000, **Functional balance between T cell chimeric receptor density and tumor associated antigen density: CTL mediated cytotoxicity and lymphokine production**, *Gene therapy*, 7(1), pp. 35-42.

de Wildt, R.M., Mundy, C.R., Gorick, B.D. & Tomlinson, I.M., 2000, **Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions**, *Nature biotechnology*, 18(9), pp. 989-94.

Wilson, D.S., Keefe, A.D. & Szostak, J.W., 2001, **The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), pp. 3750-5.

Winter, G. & Harris, W.J., 1993, **Humanized antibodies**, *Immunology today*, 14(6), pp. 243-6.

Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. & Hoogenboom, H.R., 1994, **Making antibodies by phage display technology**, *Annual review of immunology*, 12, pp. 433-55.

Wolkowicz, R., Jager, G.C. & Nolan, G.P., 2005, **A random peptide library fused to CCR5 for selection of mimetopes expressed on the mammalian cell surface via retroviral vectors**, *The Journal of biological chemistry*, 280(15), pp. 15195-201.

Wu, P., Kudrolli, T.A., Chowdhury, W.H., Liu, M.M., Rodriguez, R. & Lupold, S.E., 2010, **Adenovirus targeting to prostate-specific membrane antigen through virus-displayed, semirandom peptide library screening**, *Cancer research*, 70(23), pp. 9549-53.

Yewdell, J.W. & Bennink, J.R., 1992, **Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes**, *Advances in immunology*, 52, pp. 1-123.

Yélamos, J. **Mecanismos de generación de la diversidad de anticuerpos. En "Anticuerpos Monoclonales. Realidades y Perspectivas"** (2004) *Editorial Complutense, Madrid*.

Zauderer M (2002) US Patent. Application number 20.020.123.057A1.

Zhang, L., Giraudo, E., Hoffman, J.A., Hanahan, D. & Ruoslahti, E., 2006, **Lymphatic zip codes in premalignant lesions and tumors**, *Cancer research*, 66(11), pp. 5696-706.

ANEXO I: RELACIÓN DE CLONES REPRESENTATIVOS DE CADA GENOTECA

ANEXO I (A)				
Genoteca Griffin naif				
NºClon	Familia V _H	Nombre del Gen V _H	Familia V _L	Nombre del Gen V _L
31	VH1	DP-3+IGHV1-f*01	VL1	V1-16, IGLV1-44*01
70	VH1	DP-1/HC15-1	VL1	V1-16, IGLV1-44*01
42	VH3	DP-39/HC16-8	VL1	IGLV1-41*01
110	VH1	VP-75/VI-2...+, VH1-2, IGHV1-2*02	VL1	IGLV1-47*01
26	VH1	DP-4/VH1.45+IGHV1-45*02	VL1	VL1-18, IGLV1-50*01
109	VH1	DP-1/HC15-1	VL3	V2-1, IGLV3-1*01
29	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL1	IGLV1-47*01
2	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
17	VH5	V186.2, 186.2, VHJ558, J558.75.177, IGHV152*01	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
68	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
76	VH1	COS-14/HC15-5	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
85	VH6	IGHV6	VL3	L25, IGKV3/OR2-268*02, IGKV3D-7*01
93	VH1	DP10/hv1051...+, IGHV1-69*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
107	VH1	DP-75/VI2...+, VH1-2, IGHV1-2*02	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
12	VH1	DP-5/VI-24P+, VH1-24, IGHV1-24*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
32	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL1	V1-11, IGLV1-36*01
111	VH1	DP-1/HC15-1	VL1	V1-11, IGLV1-36*01
52	VH1	DP-25/VI-3b+, IGHV1-3*01	VL1	V1-11, IGLV1-36*01
55	VH1	DP-25/VI-3b+, IGHV1-3*01	VL1	V1-11, IGLV1-36*01
16	VH1	DP-3+IGHV1-f*01	VL9	IGLV9-49*01
13	VH4	DP-71/3d197d...+, VH4-59, IGHV4-59*09, IGHV4-59*01	VL9	IGLV9-49*01
40	VH1	DP-1/HC15-1	VL9	IGLV9-49*01
28	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	A2, IGKV2D-29*01
35	VH1	DP-5/VI-24P+, VH1-24, IGHV1-24*01	VL2	A2, IGKV2D-29*01
25	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL1	04, 014, IGKV1D-37*01
14	VH1	DP-3+IGHV1-f*01	VL2	IGKV2
84	VH1	DP-4/VH1.45+IGHV1-45*02	VL2	A3, A19, IGKV2D-28*01, IGKV2-28*01
103	VH5	V186.2, 186.2, VHJ558, J558.75.177, IGHV152*01	VL2	A2, IGKV2D-29*01
79	VH1	VH1-58, IGHV1-58*02	VL2	011, 01, IGKV2D-40*01, IGKV2-40*01
100	VH1	DP-75/VI2...+, VH1-2, IGHV1-2*02	VL2	A3, A19, IGKV2D-28*01, IGKV2-28*01
94	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL1	L5, IGKV1-12*02, IGKV1-12*01
106	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL1	L5, IGKV1-12*02, IGKV1-12*01

ANEXO I (A)				
Genoteca Griffin naif				
NºClon	Familia V _H	Nombre del Gen V _H	Familia V _L	Nombre del Gen V _L
64	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL1	L19, IGKV1D-12*01
62	VH1	DP-1/HC15-1	VL1	(24, IGKV1D-8*01
96	VH1	DP-10, hv1051...+, IGHV1-69*01	VL1	L24, IGKV1D-8*01
97	VH3	V3-53+, VH3-53, IGHV3-53*01	VL1	L24, IGKV1D-8*01
95	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL4	B3, IGKV4-1*01
69	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL1	VL1, IGLV1*01
99	VH7	VHSM7.a4.108, IGHV14-4*02	VL4	76con, 4-56, ap4, IGKV4-57*01
21	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL4	V5-1, IGLV4-3*01
81	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL1	V1-11, IGLV1-36*01
30	VH6	IGHV6	VL2	A7, IGKV2D-24*01
65	VH6	IGHV6	VL3	L25, IGKV3/OR2-268*02, IGKV3D-7*01
24	VH4	IGHV6	VL3	V2-1, IGLV3-1*01
10	VH6	IGHV6	VL1	(GLV1-47*01
98	VH6	IGHV6	VL2	V1-9, IGLV2-33*01
63	VH4	VH5/4d76...+DP-63/VH4-21...+, VH4-34, VGH4-34*01	VL1	IGLV1-40*02
71	VH4	DP-66/V71-2...+, IGHV4-61*07, IGHV4-61*01	VL2	V1.4, IGLV2-14*01
47	VH3	DP-39/HC16-8	VL1	(GLV1-41*01
23	VH4	IGHV4	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
72	VH3	DP-45	VL2	V1-7, IGLV2-23*03, IGLV2-23*01
91	VH3	V3-53+, VH3-53, IGHV3-53*0)	VL1	V1-11, IGLV1-36*01
ANEXO I (B)				
Genoteca Griffin post-selección 1 (S1)				
NºClon	Familia V _H	Nombre del Gen V _H	Familia V _L	Nombre del Gen V _L
35	VH1	hv1f10t, DP7/21-2...+, VH1-46, IGHV1-46*03, IGHV1-46*01	VL2	011, 01, IGKV2D-40*01, IGKV2-40*01
67	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01)	VL2	011, 01, IGKV2D-40*01, IGKV2-40*01
119	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL2	V1-9, IGLV2-33*01
69	VH1	DP-15/V1-8+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL2	A3, A19, IGKV2D-28*01, IGKV2-28*01
25	VH1	DP-3+, IGHV1-f*01	VL2	A7, IGKV2D-24*01
135	VH1	DP-3+, IGHV1-f*01	VL3	A27, IGKV3-20*01
75	VH5	DP-73/V5-51...+, VH5-51, IGHV5-51*01	VL2	A2, IGKV2D-29*01
99	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL2	A17, IGKV2-30*01
146	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL2	A17, IGKV2-30*01
4	VH5	DP-73/V5-51...+, VH5-51, IGHV5-51*01	VL3	V2-13, IGLV3-19*01

ANEXO I (B)		Genoteca Griffin post-selección 1 (S1)		
NºClon	Familia V _H	Nombre del Gen V _H	Familia V _L	Nombre del Gen V _L
102	VH3	DP31/V3-9P...+VH3-9, IGHV3-9*01	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
114	VH1	DP-25/VI-3b, IGHV1-3*01	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
66	VH1	DP-75/VI-2...+, VH1-2, IGHV1-2*02	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
145	VH1	DP-75/VI-2...+, VH1-2, IGHV1-2*02	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
58	VH1	DP-1/HC15-1	VL8	V3-4, IGLV8-61*01
80	VH1	DP-1/HC15-1	VL8	V3-4, IGLV8-61*01
47	VH1	DP-5/VH1-24P+VH1-24, IGHV1-24*01	VL4	V5-1, IGLV4-3*01
55	VH1	DP-4+, VH1-45, IGHV1-45*02	VL4	V5-1, IGLV4-3*01
79	VH1	DP-1/HC15-1	VL4	V5-1, IGLV4-3*01
64	VH1	DP-1/HC15-1	VL4	V5-1, IGLV4-3*01
108	VH1	hvl1f10t, DP7/21-2...+, VH1-46, IGHV1-46*03, IGHV1-46*01	VL4	V5-1, IGLV4-3*01
53	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL4	V5-1, IGLV4-3*01
9	VH6	(GHV6	VL1	V1-11, IGLV1-36*01
111	VH6	IGHV6	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
132	VH6	IGHV6	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
59	VH6	IGHV6	VL2	011, 01, IGKV2D-40*01, IGKV2-40*01
90	VH6	IGHV6	VL1	04, 014, IGKV1D-37*01, IGKV1-37*01
131	VH6	IGHV	VL1	04, 014, IGKV1D-37*01, IGKV1-37*01
112	VH6	GHV6	VL1	L24, IGKV1D-8*01
15	VH4		VL9	IGLV9-49*01
34	VH3	GHV3	VL1	V1-11, IGLV1-36*01
83	VH3	DP-45	VL2	V1-7, IGLV2-23*03, IGLV2-23*01
121	VH4	VH5/4d76...+, DP-63/VH4.21...+, VH4-34, IGHV4-34*01	VL2	V1-7, IGLV2-23*03, IGLV2-23*01
18	VH1	DP-1/HC15-1	VL1	V1-17, IGLV1-47*02
96	VH1	DP-1/HC15-1	VL1	V1-17, IGLV1-47*02
2	VH1	DP-1/HC15-1	VL1	V1-17, IGLV1-47*02
45	VH5	DP-73/V5-51...+, VH5-51, IGHV5-51*01	VL1	V1-18, IGLV1-50*01
40	VH1	DP-10/HV1051...+, IGHV1-69*01	VL1	V1-11, IGLV1-36*01
140	VH1	DP-10/hv1051...+, IGHV1-69*01	VL1	V1-16, IGLV1-44*01
37	VH1	hvl1f10t, DP7/21-2...+, VH1-46, IGHV1-46*03, IGHV1-46*01	VL1	IGLV1-47*01
139	VH1	hvl1f10t, DP-7/21-2...+, VH1-46, IGHV1-46*03, IGHV1-46*01	VL1	L24, IGKV1D-8*01
86	VH1	DP-75/VI-2...+, VH1-2, IGHV1-2*02	VL1	IGLV1-47*01
65	VH1	DP-75/VI-2...+, VH1-2, IGHV1-2*02	VL1	IGLV1-47*01

ANEXO I (B)				
Genoteca Griffin post-selección 1 (S1)				
NºClon	Familia V _H	Nombre del Gen V _H	Familia V _L	Nombre del Gen V _L
60	VH1	DP-4+, VH1-45, IGHV1-45*02	VL1	IGLV1-47*01
70	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL1	V1-16, IGLV1-44*01
91	VH1	COS-14/HC15-5	VL1	V1-16, IGLV1-44*01
133	VH1	COS-14/HC15-5	VL3	V2-1, IGLV3-1*01
92	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL1	IGLV1-47*01
61	VH5	DP-73/V5-51...+, VH5-51, IGHV5-51*01	VL1	L8, IGKV1-9*01
63	VH5	DP-73/V5-51...+, VH5-51, IGHV5-51*01	VL7	IGLV7-46*01
49	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL1	04, 014, IGKV1D-37*01, IGKV1-37*01
56	VH7	(VI-4.1b+, IGHV7-4-1*01	VL1	04, 014, IGKV1D-37*01, IGKV1-37*01
31	VH1	DP-10/HV1051...+, IGHV1-69*01)	VL1	L24, IGKV1D-8*01
107	VH1	DP-25/VI-3b, IGHV1-3*01	VL4	B3, IGKV4-1*01
115	VH1	DP-25/VI-3b, IGHV1-3*01	VL4	B3, IGKV4-1*01
24	VH1	VH1-58, IGHV1-58*02	VL2	011, 01, IGKV2D-40*01, IGKV2-40*01
16	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL3	A11, IGKV3D-20*01
28	VH4	DP-68/1.9II...+ 4.42/VH4.13..., VH4-28, IGHV4-28*03, IGHV4-28*01	VL1	L24, IGKV1D-8*01
130	VH3	DP-48/13-2+, VH3-13, IGHV3-13*01	VL1	O8, O18, IGKV1D-33*01, IGKV1-33*01
120	VH1	DP-75/VI-2...+, VH1-2, IGHV1-2*02	VL1	O8, O18, IGKV1D-33*01, IGKV1-33*01
136	VH1	DP-75/VI-2...+, VH1-2, IGHV1-2*02	VL3	L25, IGKV3/OR2-268*02, IGKV3D-7*01
141	VH4	DP-66/V71-2...+, IGHV4-61*07, IGHV4-61*01	VL1	V1-19, IGLV1-51*01
ANEXO I (C)				
Genoteca Griffin post-selección 2 (S2)				
NºClon	Familia V _H	Nombre del Gen V _H	Familia V _L	Nombre del Gen V _L
46	VH4	DP-70/4d68...+, IGHV4-4*02	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
87	VH1	DP-5/VI-24P+, VH1-24, IGHV1-24*01	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
135	VH4	DP-69/4d255...	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
138	VH4	DP-68/1.9II...+, 4.42/VH4.13..., VH4-28, IGHV4-28*03, IGHV4-28*01	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
10	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL1	V1-16, IGLV1-44*01
79	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL3	V2-13, IGLV3-19*01
133	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL1	IGLV1-47*01
59	VH1	DP-5/VI-24P+, VH1-24, IGHV1-24*01	VL1	V1-16, IGLV1-44*01

ANEXO I (C)		Genoteca Griffin post-selección 2 (S2)		
NºClon	Familia VH	Nombre del Gen V _H	Familia V _L	Nombre del Gen V _L
92	VH1	DP-1/HC15-1	VL1	IGLV1-47*01
86	VH1	DP-10/hv1051...+, IGHV1-69*01	VL1	IGLV1-47*01
109	VH1	DP-4, VH1-45, IGHV1-45*02	VL1	V1-16, IGLV1-44*01
25	VH5	DP-73/V5-51...+, VH5-51, IGHV5-51*01	VL2	V1-9, IGLV2-33*01
76	VH5	DP-73/V5-51...+, VH5-51, IGHV5-51*01	VL2	V1-9, IGLV2-33*01
2	VH1	DP-3+, IGHV1f*01	VL2	V1-9, IGLV2-33*01
145	VH1	DP-3+, IGHV1-f*01	VL2	V1-9, IGLV2-33*01
155	VH1	DP-3+, IGHV1-f*01	VL1	V1-16, IGLV1-44*01
123	VH1	DP-3+, IGHV1-f*01	VL1	IGLV1-41*01
39	VH1	DP-1/HC15-1	VL4	V5-1, IGLV4-3*01
98	VH5	DP-73/V5-51...+, VH5-51, IGHV5-51*01	VL9	IGLV9-49*01
12	VH5	DP-73/V5-51...+, VH5-51, IGHV5-51*01	VL1	08, 018, IGKV1D-33*01, IGKV1-33*01
91	VH5	DP-73/V5-51...+, VH5-51, IGHV5-51*01	VL1	02, 012, IGKV1D-39*01, IGKV1-39*01
89	VH5	DP-73/V5-51...+, VH5-51, IGHV5-51*01	VL2	011, 01, IGKV2D-40*01, IGKV2-40*01
71	VH1	DP-1/HC15-1	VL2	IGKV2
72	VH1	DP-3+, IGHV1f*01	VL2	A3, A19, IGKV2D-28*01, IGKV2-28*01
27	VH1	DP-75/VI-2...+, VH1-2, IGHV1-2*02	VL9	IGLV9-49*01
22	VH1	DP-4, VH1-45, IGHV1-45*02	VL3	L25, IGKV3/OR2-268*02, IGKV3D-7*01
160	VH1	DP-4+, VH1-45, IGHV1-45*02	VL1	VL1, IGLV1*01
105	VH1	DP-1/HC15-1	VL2	011, 01, IGKV2D-40*01, IGKV2-40*01
62	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	A2, IGKV2D-29*01
77	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	A2, IGKV2D-29*01
140	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	A2, IGKV2D-29*01
82	VH5	DP-73/V5-51...+, VH5-51, IGHV5-51*01	VL1	L8, IGKV1D-16*01
102	VH1	DP-75/VI-2...+, VH1-2, IGHV1-2*02	VL1	L15, IGKV1D-16*01
30	VH6	IGHV6	VL2	V1-9, IGLV2-33*01
43	VH6	IGHV6	VL2	V1-9, IGLV2-33*01
35	VH6	IGHV6	VL2	V1-9, IGLV2-33*01
3	VH6	IGHV6	VL1	V1-16, IGLV1-44*01
52	VH6	IGHV6	VL1	V1-11, IGLV1-36*01
36	VH6	IGHV6	VL1	L8, IGKV1-9*01
128	VH6	IGHV6	VL1	L8, IGKV1-9*01
81	VH6	IGHV6	VL1	L15, IGKV1D-16*01
17	VH6	IGHV6	VL2	A7, IGKV2D-24*01
134	VH6	IGHV6	VL3	V2-1, IGLV3-1*01

ANEXO I (C)				
Genoteca Griffin post-selección 2 (S2)				
NºClon	Familia V _H	Nombre del Gen V _H	Familia V _L	Nombre del Gen V _L
57	VH4	DP-71/3d179d...+, VH4-59, IGHV4-39*09	VL3	L25, IGKV3/OR2-268*02, IGKV3D-7*0)
99	VH3	DP-31/V3-9P...+, VH3-9, IGHV3-9*01	VL1	L8, IGKV1-9*01
115	VH3	DP-39/HC16-8...	VL1	08, 018, IGKV1D-33*01, IGKV1-33*01
148	VH1	DP-15/V1-8+, VH1-8, IGHV1-8*01	VL2	A1, IGKV2D-30*01
159	VH1	COS-14/HC15-5	VL3	L25, IGKV3/OR2-268*02, IGKV3D-7*01
146	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL3	A27, IGKV3-20*01
158	VH1	hvl1f10t, DP-7/21-2...+, VH1-46, IGHV1-46*03, IGHV1-46*01	VL3	V2-1, IGLV3-1*01
ANEXO I (D)				
Genoteca Griffin post-selección 3 (S3)				
NºClon	Familia V _H	Nombre del Gen V _H	Familia V _L	Nombre del Gen V _L
45	VH1	DP-10/hv1051...+, IGHV1-69*01	VL1	V1-16, IGLV1-44*01
79	VH1	DP-10/hv1051...+, IGHV1-69*01	VL1	V1-16, IGLV1-44*01
96	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL1	V1-16, IGLV1-44*01
109	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL1	V1-16, IGLV1-44*01
65	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL1	V1-17, IGLV1-47*02
196	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL1	IGLV1-47*01
88	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL8	V3-4, IGLV8-61*01
103	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL8	V3-4, IGLV8-61*01
169	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL8	V3-4, IGLV8-61*01
127	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL8	V3-4, IGLV8-61*01
173	VH7	VI-4.1b+, IGHV7-4-1*02	VL8	V3-4, IGLV8-61*01
3	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL2	A17, IGKV2-30*01
170	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL1	L15, IGKV1D-16*01
102	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL1	L15, IGKV1D-16*01
158	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL1	L15, IGKV1D-16*01
152	VH1	DP-14/V1-18+, VH1-18, IGHV1-18*01	VL1	L15, IGKV1D-16*01
26	VH1	DP-1/HC15-1	VL2	A2, IGKV2D-29*01
160	VH1	DP-1/HC15-1	VL2	A2, IGKV2D-29*01
153	VH1	DP-1/HC15-1	VL2	A2, IGKV2D-29*01
117	VH1	DP-1/HC15-1	VL2	A2, IGKV2D-29*01
193	VH1	DP-1/HC15-1	VL2	A2, IGKV2D-29*01
47	VH1	DP-5/V1-24P+, VH1-24, IGHV1-24*01	VL9	IGLV9-49*01

ANEXO I (D)				
Genoteca Griffin post-selección 3 (S3)				
NºClon	Familia V _H	Nombre del Gen V _H	Familia V _L	Nombre del Gen V _L
5	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
76	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
20	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
22	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
80	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
87	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
12	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
27	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
16	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
159	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
155	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
189	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
142	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
122	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
202	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
211	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
98	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
209	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
200	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
180	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
214	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
148	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
175	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
100	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
183	VH1	DP-2/V71-5+, IGHV1-58*01	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
28	VH1	DP-88/hv1051K...+, VH1-69, IGHV1-69*06	VL2	V1-4, IGLV2-14*01
191	VH1	V3-30+, DP-49/1.9III...+, VH3-30, IGHV3-30*18, IGHV3-30*03	VL2	V1-9, IGLV2-33*01
217	VH1	V3-30+, DP-49/1.9III...+, VH3-30, IGHV3-30*18, IGHV3-30*03	VL2	V1-9, IGLV2-33*01
90	VH3	V3-30+, DP-49/1.9III...+, VH3-30, IGHV3-30*18, IGHV3-30*03	VL2	V1-9, IGLV2-33*01
219	VH1	DP-10/hv1051...+, IGHV1-69*01	VL1	L24, IGKV1D-8*01
97	VH1	DP-10/hv1051...+, IGHV1-69*01	VL1	L24, IGKV1D-8*01
177	VH1	DP-10/hv1051...+, IGHV1-69*01	VL1	L24, IGKV1D-8*01
19	VH1	DP-10/hv1051...+, IGHV1-69*01	VL1	L24, IGKV1D-8*01
188	VH1	DP-10/hv1051...+, IGHV1-69*01	VL1	L8, IGKV1-9*01
177	VH1	DP-10/hv1051...+, IGHV1-69*01	VL2	V1-9, IGLV2-33*01
38	VH6	IGHV6	VL1	L8, IGKV1-9*01
163	VH1	DP-75/VI-2...+, VH1-2, IGHV1-2*02	VL1	IGLV1-47*01
128	VH3	DP-58/hv3d1EG, IGHV3-48*03	VL1	IGKV1

Clones idénticos agrupados en cuadros

ANEXO II: ARTÍCULOS PUBLICADOS, PATENTES Y MODELOS DE UTILIDAD

Durante el desarrollo de esta Investigación se han generado una serie de resultados que han sido recogidos en una serie de artículos y de patentes cuyas referencias aparecen aquí indicadas. Aquellas publicaciones que están directamente relacionadas y forman parte de esta Tesis Doctoral, aparecen completas a continuación.

ARTÍCULOS PUBLICADOS:

Sanz L, Santos-Valle P, **Alonso-Camino V**, Salas C, Serrano A, Vicario JL, Cuesta AM, Compte M, Sánchez-Martín D, Alvarez-Vallina L, 2008, **Long term *in vivo* imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels.** *Microvascular Research*, 75(3) 308-314

Compte M, Cuesta AM, Sánchez-Martín D, **Alonso-Camino V**, Vicario JL, Sanz L, Alvarez-Vallina L, 2009, **Tumor immunotherapy using gene-modified human mesenchymal stem cells loaded into synthetic extracellular matrix scaffolds.** *Stem Cells* 27(3) 753-60.

* **Alonso-Camino V**, Sánchez-Martín D, Compte M, Sanz L, Alvarez-Vallina L, 2009, **Lymphocyte display: A novel Antibody Selection Platform based on T Cell Activation** *Plos One* 24;4(9) e7174.

Compte M, **Alonso-Camino V**, Santos-Valle P, Cuesta AM, Sánchez-Martín D, Rodríguez López M, Vicario JL, Sanz L and Álvarez-Vallina L, 2010, **Factory Neovessels: Engineered Human Blood Vessels Secreting Therapeutic Proteins as a New Drug Delivery System.** *Gene Therapy* Jun;17(6) PÁGINAS: 745-51

* **Alonso-Camino V**, Santos-Valle P, Ispizua MC, Sanz L and Álvarez-Vallina L, 2011, **Engineered Human Tumor Xenografts with Functional Human Vascular Networks.** *Microvascular Research*. Jan;81(1) PÁGINAS: 18-25. Epub 2010 Oct 8.

* **Alonso-Camino V**, Compte M, Vile R and Álvarez-Vallina L. **Isolation of functional human antibodies by T lymphocyte display.** (enviado para su publicación).

* Artículos que ha dado lugar este trabajo

PATENTES Y MODELOS DE UTILIDAD:

Patente: *Modelo Animal de Angiogénesis Humana y sus aplicaciones.*

Inventores (p.o. de firma): Luis Álvarez-Vallina, Laura Sanz Alcober, Patricia Santos-Valle, **Vanesa Alonso-Camino**, Ángel Cuesta Martínez, Marta Compte Grau, David Sánchez-Martín, Félix Bonilla Velasco.

Número de solicitud: P200800077

Entidad titular: FUAM

Patente: *Plataforma de selección de anticuerpos basada en la activación de Linfocitos*

Inventores (p.o. de firma): Luis Álvarez-Vallina , **Vanesa Alonso-Camino**, David Sánchez-Martín, Marta Compte Grau, Laura Sanz Alcober, Félix Bonilla Velasco,

Número de solicitud: P4908ES

Entidad titular: FUAM

Entidad titular: FUAM

Lymphocyte Display: A Novel Antibody Selection Platform Based on T Cell Activation

Vanessa Alonso-Camino, David Sánchez-Martín, Marta Compte, Laura Sanz, Luis Álvarez-Vallina*

Molecular Immunology Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, Spain

Abstract

Since their onset, display technologies have proven useful for the selection of antibodies against a variety of targets; however, most of the antibodies selected with the currently available platforms need to be further modified for their use in humans, and are restricted to accessible antigens. Furthermore, these platforms are not well suited for *in vivo* selections. We present here a novel cell based antibody display platform, which takes advantage of the functional capabilities of T lymphocytes. The display of antibodies on the surface of T lymphocytes, as a part of a chimeric-immune receptor (CIR) mediating signaling, may ideally link the antigen-antibody interaction to a demonstrable change in T cell phenotype, due to subsequent expression of the early T cell activation marker CD69. In this proof-of-concept, an *in vitro* selection was carried out using a human T cell line lentiviral-transduced to express a tumor-specific CIR on the surface, against a human tumor cell line expressing the carcinoembryonic antigen. Based on an effective interaction between the CIR and the tumor antigen, we demonstrated that combining CIR-mediated activation with FACS sorting of CD69⁺ T cells, it is possible to isolate binders to tumor specific cell surface antigen, with an enrichment factor of at least 10³-fold after two rounds, resulting in a homogeneous population of T cells expressing tumor-specific CIRs.

Citation: Alonso-Camino V, Sánchez-Martín D, Compte M, Sanz L, Álvarez-Vallina L (2009) Lymphocyte Display: A Novel Antibody Selection Platform Based on T Cell Activation. PLoS ONE 4(9): e7174. doi:10.1371/journal.pone.0007174

Editor: Wasif N. Khan, University of Miami, United States of America

Received: May 22, 2009; **Accepted:** August 30, 2009; **Published:** September 24, 2009

Copyright: © 2009 Alonso-Camino et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Grants BIO2005-04794 and BIO2008-03233 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (www.micinn.es), and S-BIO-0236-2006 from the Comunidad Autónoma de Madrid (www.madrid.org) to L.A.-V; and Grant PI061621 from the Fondo de Investigación Sanitaria (www.isciii.es) to L.S. V.A.C. is a predoctoral fellowship (BF107.132) from the Gobierno Vasco. D.S.-M. is supported by a Comunidad Autónoma de Madrid/European Social Fund training grant (FPI-000531). M.C. is supported by Instituto de Salud Carlos III (www.isciii.es) (Contrato Río Hortega, CM06/00055). L.S. is an investigator from the Ramon y Cajal Program (Ministerio de Ciencia e Innovación) (www.micinn.es), cofinanced by the European Social Fund. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: lalvarezv.hpth@salud.madrid.org

Introduction

The display of foreign polypeptides and proteins on the surface of viruses or cells provides an important tool for the engineering of biomolecules and the analysis of their interactions with binding partners [1–3]. The microbial surface display technologies for screening antibody libraries include phage, yeast and bacteria platforms [4]. Cell-free systems, as ribosomal display, are also available [4].

Although the above mentioned systems have been successfully used for the isolation of antibodies, concerns may rise about the lack of post-translational modifications and proper folding of selected proteins. In order to allow processing of the displayed antibody in a eukaryotic environment, screening systems based on viruses and mammalian cells have been described.

The potential of retroviral display for the generation and screening of eukaryotic expression libraries has been demonstrated for small peptides [5,6] and antibodies [3,7]. Remarkably, antibodies selected from retroviral libraries exhibit CDR sequences clearly different to those of antibodies selected from phage libraries [3]. We could hypothesize that these differences arise from the adaptation of molecular parameters, such as codon usage, polypeptide folding and resistance to inactivation by mammalian cell proteases. Although other mammalian cell surface display platforms have been developed [8–11], such

methods, similar to phage and ribosome display, are enrichment techniques based purely on physical interactions and require multiple rounds of selection to be carried out. This is an important drawback; specially taking into account the limited number of antibodies that can be screened in a mammalian cell-based platform

In this report, we describe the design and testing of a mammalian cell surface display platform in T lymphocytes. The display of single chain antibodies (scFv) on the surface of T lymphocytes, as a part of a fusion protein mediating signaling, may ideally link the interaction of scFvs with their antigen to a demonstrable change in T cell phenotype, due to subsequent expression of activation molecules. Chimeric immune receptor (CIR) genes are composed of a recognition unit attached to the transmembrane and intracytoplasmic sequences of a signalling molecule derived either from the ζ chain of the TCR/CD3 complex or from the γ chain associated with some Fc receptors (FcR) [12]. CIRs enable us to target various types of effector cells toward any tumor-associated antigen (TAA) for which a suitable mAb exists [13]. These Ag-selective cell therapies have been designed to convert therapeutically important TAAs, expressed on the cell surface, into recruitment points of effector functions, and to address the goal of MHC- and exogenous cytokine-independent activation of effector cells, highly restricted to tumor areas. Upon encountering antigen, the interaction of the grafted CIR triggers

effector functions and can mediate cytolysis of tumor cells [14]. The utility and effectiveness of the CIR approach have been demonstrated in a variety of animal models where tumor-specific CIRs drove the adoptive transferred autologous T lymphocytes to accumulate at the tumor site *in vivo* and prevented tumor growth [13,14].

The platform presented in this paper allows a positive selection based on both the existence of an effective interaction, and the expression of the early T cell activation marker CD69. The surface level of CD69 can be used both as a “quality control” of antibody interaction, and as a sorting parameter. Using a human T cell line, gene-modified to express a tumor-specific CIR on their surface, and a human tumor cell line we demonstrated that combining CIR-mediated activation with FACS sorting of CD69⁺ T cells, it is possible to isolate binders to tumor specific cell surface antigen, with an enrichment factor of 10³-fold after two rounds.

Results

Construction of a lentiviral vector encoding a tumor-specific CIR

In order to generate a model for validating a selection platform based on molecular and cellular events associated with T cell activation, we constructed the HIV-1 based lentiviral vector pRRL- α CEA-CIR-IRES-EGFP (Fig. 1A), containing a bicistronic expression cassette encoding a TCR ζ -based CIR and EGFP, as reporter gene. The CIR comprises a human immunoglobulin signal peptide, a FLAG epitope, and the anti-carcinoembryonic antigen (CEA) scFv antibody MFE23 [15], fused to the transmembrane and cytoplasmic regions of the human TCR ζ -chain [16].

The human T cell line Jurkat was used as a model system to express the anti-CEA CIR and to test their ability to initiate T cell activation in response to tumor specific cell surface antigen. Jurkat

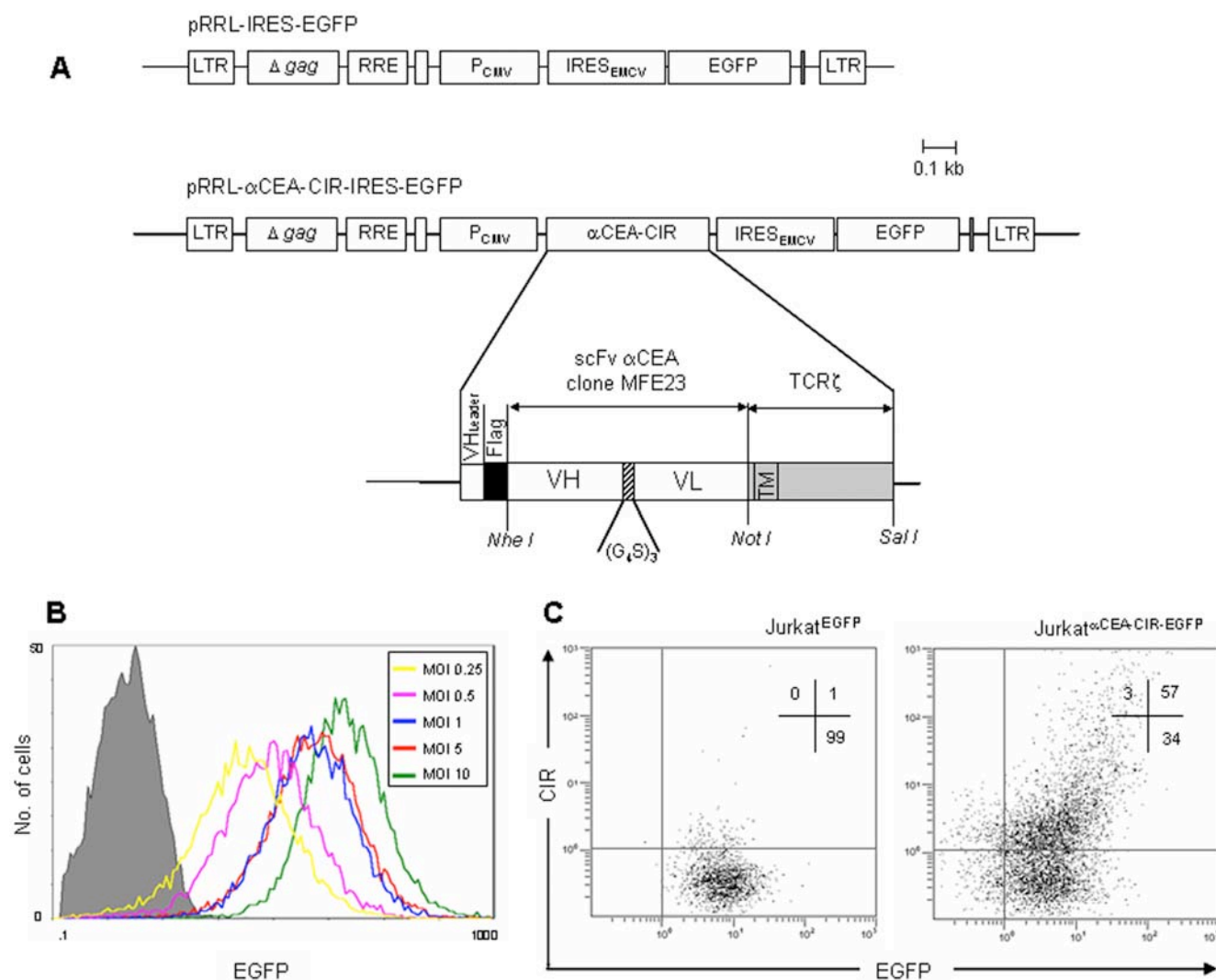


Figure 1. Schematic representation of lentiviral vector constructs. (A) Control monocistronic vector (pRRL-IRES-EGFP) containing only the enhanced-green fluorescent protein (EGFP) gene and bicistronic vector (pRRL- α CEA-CIR-IRES-EGFP) containing the chimeric immune receptor (CIR) gene and the EGFP sequence. LTR, long terminal repeats; Δ GAG, ATG-deleted group specific antigen; RRE, Rev-responsive *cis*-acting element; CMV promoter; EMCV IRES, encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site. (B) FACS analysis of EGFP expression after transduction of Jurkat cells with EGFP encoding lentiviral vectors at different MOIs, ranging from 0.25 to 10. (C) FACS analysis of EGFP and cell surface CIR expression after transduction of Jurkat cells with CIR-EGFP encoding lentiviral vectors at MOI of 1. doi:10.1371/journal.pone.0007174.g001

cells were transduced with VSV-G pseudotyped lentiviral vectors encoding EGFP at different MOIs and flow cytometry analysis was used to evaluate the level of EGFP expression (Fig. 1B). Since transduction at low MOIs did not result in a substantial decrease of the EGFP expression, Jurkat cells were infected at MOI 1 with VSV-G pseudotyped lentiviral vectors encoding both EGFP alone (EGFP) or anti-CEA CIR and EGFP (α CEA-CIR-EGFP), to ascertain expression of a single antibody species per infected cell. Flow cytometry analysis (Fig. 1C) revealed that in both cases over 95% of the cells were EGFP⁺. Analysis of cell-surface CIR expression demonstrated that approximately 60% of Jurkat α CEA-CIR-EGFP cells expressed the FLAG-tagged anti-CEA CIR at detectable levels, although there was considerable heterogeneity in the absolute levels of expression (Fig. 1C). The difference between the absolute levels of EGFP and CIR expression may be due to the different characteristics and location of both proteins.

Antigen-specific activation of T cells expressing tumor-specific CIRs

We then examined the activity of the FLAG-tagged anti-CEA CIR as a functional receptor molecule. Jurkat α CEA-CIR-EGFP cells could be activated to secrete IL-2, upon antigen-mediated ligation of their binding domain by plastic immobilized CEA (iCEA) or membrane-bound CEA (mCEA) (Fig. 2). We next investigated the expression of the very early activation antigen CD69 in Jurkat α CEA-CIR-EGFP and Jurkat^{EGFP} cells co-cultured overnight in the presence of CEA-negative (HeLa) or CEA-positive (HeLa^{CEA}) cells (Fig. 3A). The results of a representative experiment are shown in Figure 3B. On average CD69⁺ cells accounted for 40±10% of Jurkat α CEA-CIR-EGFP cells stimulated with CEA-positive cells. This result is similar to that observed after stimulation of Jurkat α CEA-CIR-EGFP cells with plastic immobilized anti-CD3 mAb (Fig. 3B). In these conditions the peak expression of cell surface CD69 occurred between 12 and 24 h (data not shown). Stimulation of Jurkat α CEA-CIR-EGFP and Jurkat^{EGFP} cells with plastic immobilized anti-CD3 mAb or stimulation of Jurkat α CEA-CIR-EGFP cells with HeLa^{CEA} cells resulted in a marked increase in EGFP reporter expression as compared to unstimulated cells (data not shown).

We have demonstrated previously that an anti-NIP CIR is able to mediate specific recognition of its cognate antigen, either immobilized (NIP-BSA conjugates) or expressed on a cell surface, resulting in the production of IL-2 by transfected Jurkat T cells [16,17]. The CIR comprises a human immunoglobulin signal peptide, the anti-NIP scFv antibody B1.8, fused to the transmembrane and

cytoplasmic regions of the human TCR ζ -chain [17]. In the current study, we found consistently that anti-NIP CIR-expressing Jurkat cells (Jurkat α ^{NIP-CIR}) could be specifically triggered, after incubation with NIP-modified target HeLa cells (HeLa^{NIP}), to express CD69 (Fig. 3B). The level of CD69 expression was similar than that observed in the same cell population in response to plastic-immobilized anti-CD3 mAb (Fig. 3B). Importantly, T cell activation remained strictly antigen-specific with NIP-negative HeLa or HeLa^{CEA} cells unable to induce CD69 expression in Jurkat α ^{NIP-CIR} cells (Fig. 3). Jurkat^{EGFP} cells or Jurkat α ^{NIP-CIR} could not be stimulated by HeLa or HeLa^{CEA} cells (Fig. 3).

To further demonstrated the specificity of CIR-mediated activation, CIR-negative parental Jurkat cells or CIR-positive Jurkat cells (Jurkat α CEA-CIR-EGFP or Jurkat α ^{NIP-CIR}) were co cultured with a panel of human unmodified tumor cell lines (Fig. 4). Only Jurkat α CEA-CIR-EGFP cells expressed CD69 after co culturing with CEA-positive MKN45 cells (Fig. 4). Parental Jurkat cells or anti-NIP CIR-expressing Jurkat cells (Jurkat α ^{NIP-CIR}) could not be activated to express CD69 with any of the tumor cell lines tested (Fig. 4). Furthermore, the viability of Jurkat^{EGFP}, Jurkat α CEA-CIR-EGFP and Jurkat α ^{NIP-CIR} cells was not affected when co-cultured for 16 hours in the presence of different types of target cells (data not shown).

Antigen-specific activation of T cells expressing tumor-specific CIRs in the presence of competitor populations

We next studied the effect of competitor non-transduced Jurkat T cells on T cell activation mediated through the anti-CEA CIR. Jurkat α CEA-CIR-EGFP cells were cultured on HeLa^{CEA} monolayers in the presence of increasing amounts of CIR-negative competitor Jurkat cells, and the expression of CD69 was analyzed by flow cytometry (Fig. 5). Our results indicate that in all these conditions the presence of competitor cells did not affect the CIR-mediated induction of CD69 expression (Fig. 5). At effector-to-competitor ratios ranging from 100:1 to 1:100 the percentage of the EGFP⁺ cells that expressed CD69 was kept close to 40% regardless of the number of competitor cells.

Selection and enrichment of T cells expressing tumor-specific CIRs

To determine whether T cells expressing CIRs on their surfaces could serve as a platform for screening and isolating binders to tumor specific cell surface antigen, Jurkat α CEA-CIR-EGFP cells and CIR-negative non-transduced Jurkat cells (Fig. 6) or CIR-positive transfected Jurkat cells (Jurkat α ^{NIP-CIR}) (Fig. 7) were mixed at decreasing concentrations of the former, with a total number of 3×10^7 and incubated overnight with confluent monolayers of HeLa^{CEA} cells, and the sensitivity of the isolation and enrichment process evaluated. Mixed Jurkat T cells were recovered from the tumor cell monolayer by EDTA treatment, ficoll purified, washed twice with medium and incubated with anti-CD69 PE mAb. At a mixing ratio 1:1000 a single round of selection by direct FACS sorting of EGFP⁺CD69⁺ cells, resulted in a two-log enrichment of anti-CEA CIR expressing Jurkat α CEA-CIR-EGFP cells, from the background CIR-negative Jurkat cell population (Fig. 6) or CIR-positive Jurkat α ^{NIP-CIR} cells. The sorted Jurkat α CEA-CIR-EGFP/1S population was propagated and submitted for an additional round of activation/selection on HeLa^{CEA} cell monolayers. After staining with anti-CD69 PE mAb and FACS sorting nearly 100% of the cells expressed EGFP (Jurkat α CEA-CIR-EGFP/2S). Overall, CIR-mediated activation of T cells combined with FACS sorting of CD69-expressing activated T cells resulted in a 10^3 fold-enrichment in a tandem two-step round of selection.

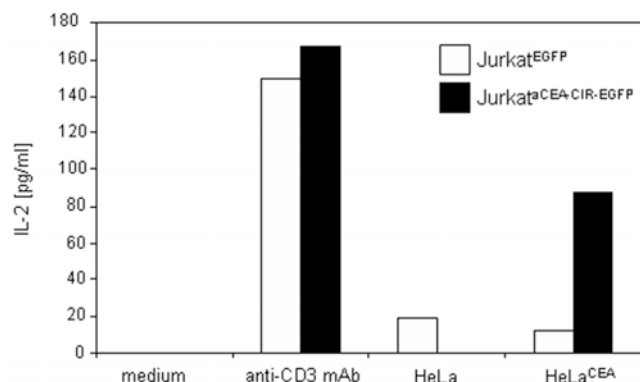


Figure 2. IL-2 production by Jurkat^{EGFP} and Jurkat α CEA-CIR-EGFP cells stimulated either with plastic immobilized anti-CD3 mAb or target cells (E:T=1:1; HeLa or HeLa^{CEA}) for 48 hours.
doi:10.1371/journal.pone.0007174.g002

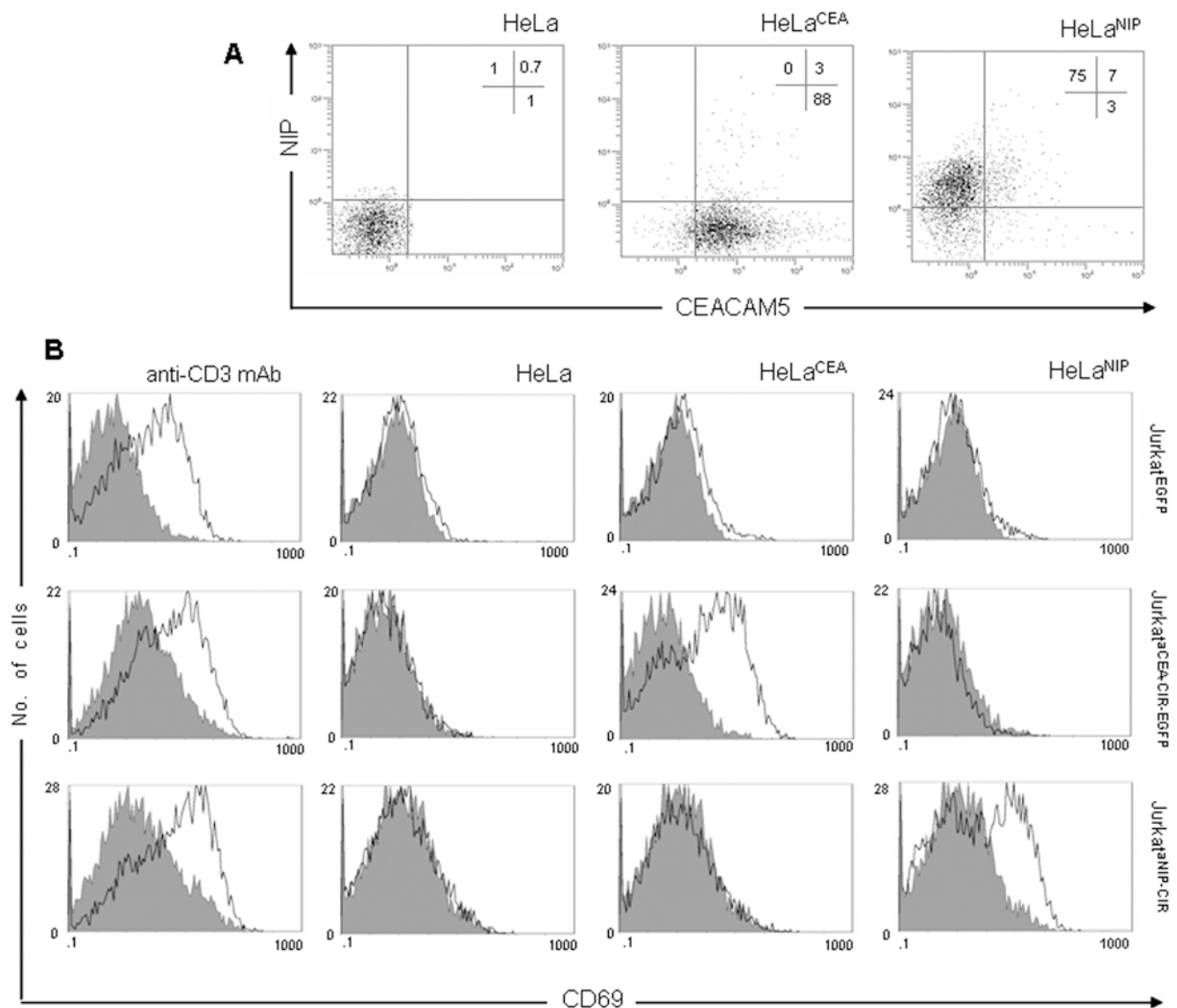


Figure 3. CIR-mediated activation of human T cells. (A) Cell-surface expression of CEACAM5 (CEA) and NIP-modified molecules on HeLa, HeLa^{CEA} and HeLa cells labeled with 2.5 μ g/mL of the hapten (HeLa^{NIP}). (B) FACS analysis of CD69 expression by Jurkat^{EGFP}, Jurkat^{CEA-CIR-EGFP} and Jurkat^{NIP-CIR} stimulated either with immobilized anti-CD3 mAb or target cells (E:T = 1:1; HeLa, HeLa^{CEA} or HeLa^{NIP}) for 16 hours. doi:10.1371/journal.pone.0007174.g003

Functional and phenotypic characterization of selected T cells expressing tumor-specific CIRs

After the second round of activation/selection, the selected population (Jurkat^{CEA-CIR-EGFP}/2S) was expanded and characterized phenotypic and functionally. Jurkat^{CEA-CIR-EGFP}/2S cells showed higher levels of EGFP and cell surface FLAG-tagged anti-CEA CIRs (with MFI values enhanced \sim 2-fold) than the initial Jurkat^{CEA-CIR-EGFP} cells (Fig. 8A). Jurkat^{CEA-CIR-EGFP}/2S cells could be activated to express CD69 or to produce IL-2, upon interaction with membrane-bound CEA (mCEA) or immobilized anti-CD3 mAb (Fig. 8B). Sequence analysis of antibody variable domains of 20 individual clones revealed no differences between the initial Jurkat^{CEA-CIR-EGFP} cells and the selected Jurkat^{CEA-CIR-EGFP}/2S cells with the exception of punctual one-nucleotide changes, derived from the PCR amplification (data not shown).

Discussion

In this study, we describe the design and use of a mammalian display platform to select scFv antibodies on complex mixtures of antigens expressed on cell surfaces. A limiting step in the selection by cell panning of phage antibodies is the high background binding of non-specific phages [4]. To overcome this limitation, we designed a positive selection method based on the display of scFv antibodies on the surface of T lymphocytes, in the context of activating molecules. The use of a chimeric scFv-TCR ζ receptor as a display fusion partner may result in gene expression in successful cases of interaction.

In fact, we demonstrated that upon encountering specific antigen on tumor cell surface, human T cells harboring anti-tumor scFv-TCR ζ receptors are able to undergo specific activation, including up-regulation of the early T-cell activation marker CD69. Combining CIR-mediated activation with FACS sorting of

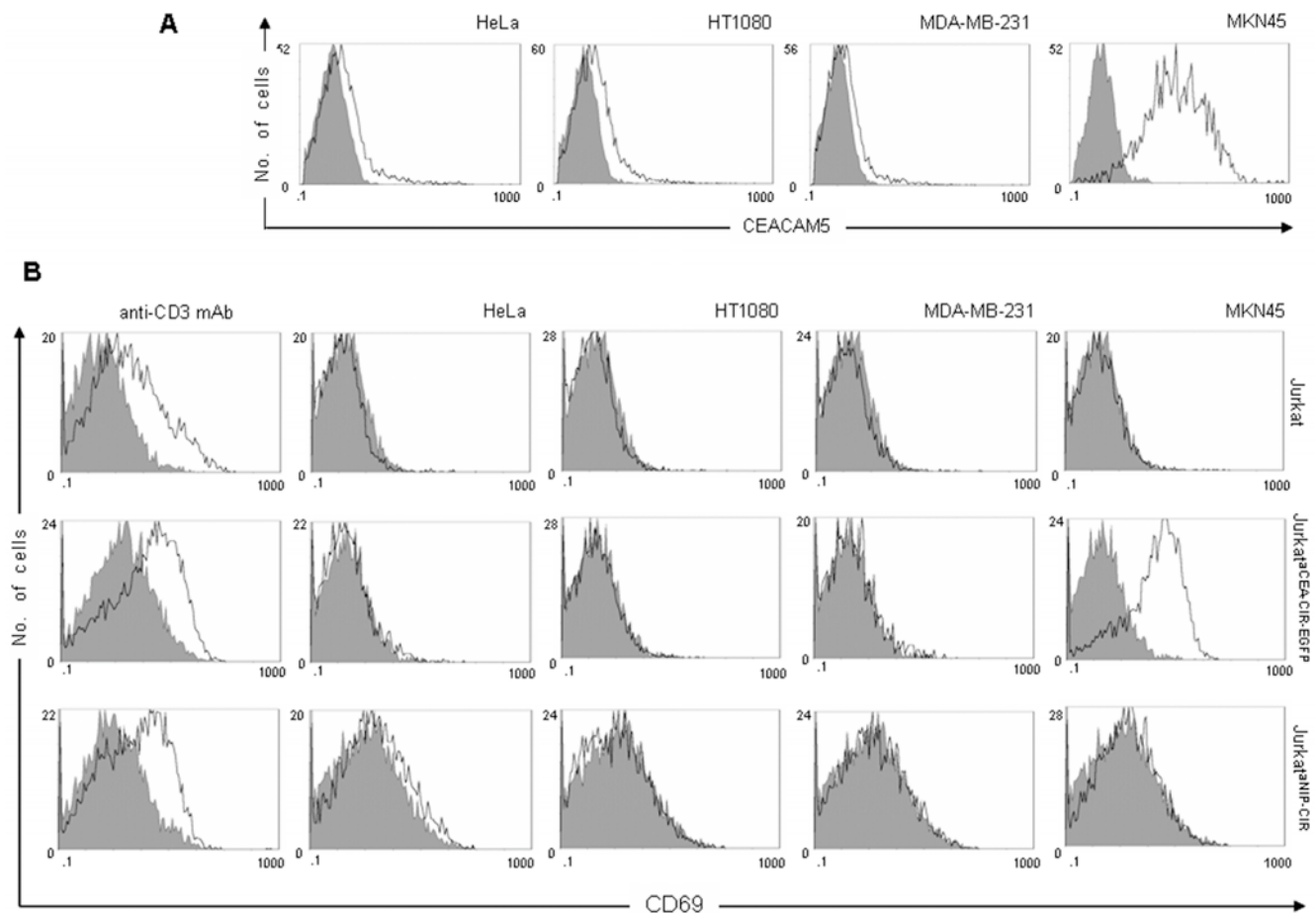


Figure 4. CIR-mediated activation of human T cells. (A) Cell-surface expression of CEACAM5 (CEA) on HeLa, HT1080, MDA-MB-231 and MKN45 cells. (B) FACS analysis of CD69 expression by Jurkat, Jurkat^{CEA-CIR-EGFP} and Jurkat^{NIP-CIR} stimulated either with immobilized anti-CD3 mAb or target cells (E:T = 1:1; HeLa, HT1080, MDA-MB-231 or MKN45) for 16 hours. doi:10.1371/journal.pone.0007174.g004

CD69⁺ T cells it is possible to detect and purify tumor-specific T cells with an enrichment factor of at least 10^3 -fold after two rounds. However, the strength of this lymphocyte display platform does not rely only on the enrichment factor, but in rescuing functional scFv antibodies capable of forming a functional immune synapse.

Recent studies have established that multidomain constructs comprising the signaling region of CD28 in series with the signaling domain of the TCR ζ chain (dual scFv-CD28-TCR ζ chimeric receptor) mediated enhanced cytokine production, and preserved cell viability [18]. Dual CIR with optimized spacer sequences, to provide accessibility and extended orientation, are ideal for surface display of antibody libraries in T lymphocytes.

In addition to the advantages of all mammalian expression libraries this novel positive selection T cell-surface display system avoids the use of elution procedures so that high affinity antibodies cannot get lost during selection. Furthermore, the interface between the tumor cell and the CIR-expressing T cell might allow selecting human antibodies towards their cognate antigens when present in their natural setup. Antibodies against transmembrane cell surface proteins that are difficult to purify in a native conformation and against epitopes that are not visible with the current display technologies might benefit from this platform. The use of lentiviral-based vectors allows to precisely dose infection rates, ensuring expression of no more than one antibody

per cell. However, one major drawback of antibody screening in mammalian cells is the relative small number of cells that can be handled at time. Thus, whereas phage display routinely allows for the screening of 10^{12} clones in a single panning round [2], the throughput of a mammalian screening procedure in an one-antibody-per-cell format is in the range of 10^6 to 10^7 clones that can be analyzed concomitantly [8].

This “repertoire diversity” limitation might be ameliorated thanks to its better fit to specific scenarios, for example *in vivo* selections. Systemically administered bacteriophages have to survive destruction by immune effector mechanisms [19] which counts for a fast depletion *in vivo*, avoid non-specific adhesion to vessel walls [20] and avoid sequestration by organ systems such as the Kupffer cells [21], thus, diminishing the actual repertoire size at the “point of selection” (whether a solid tumor, a disease model, organ-specific vasculature, etc). In addition phage particles represent an inert carrier, with void or limited extravasation ability, which allows the recovery of displayed peptides homing preferentially to the target tissue due to their binding to tissue-specific vascular receptors [22], but poses further restrictions for the *in vivo* selections beyond the luminal surface of the vasculature. The present platform overcomes these limitations: unlike viral particles, immune effector cells can migrate actively and efficiently through microvascular walls, and penetrating the core of solid tumors. In this context, a repertoire of systemically administered CIR-display T lymphocytes can move

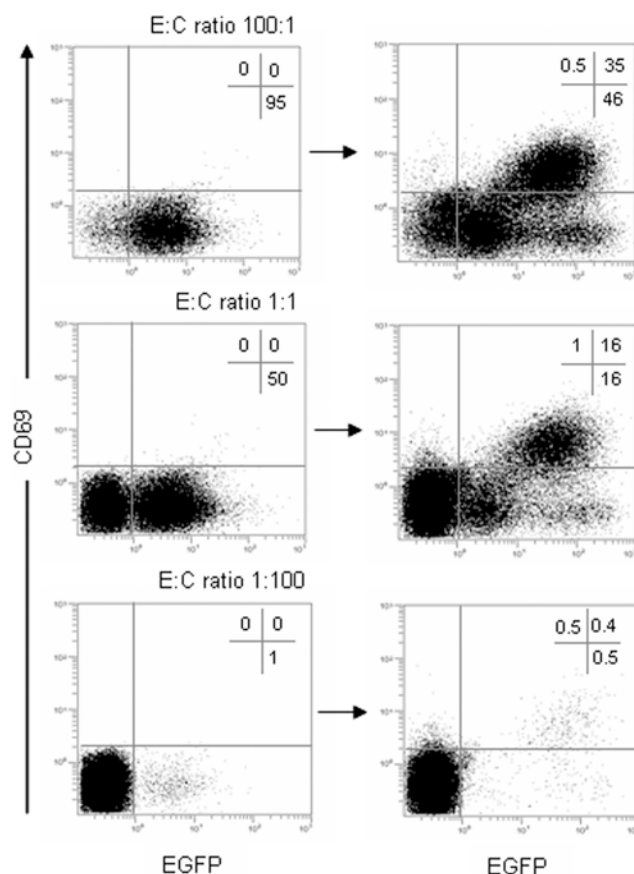


Figure 5. Effect of competitor populations on CIR-mediated T cell activation. CIR-positive Jurkat^{CEA-CIR-EGFP} effector (E) cells were stimulated with CEA-positive target cells for 16 hours in the presence of increasing amounts of CIR-negative Jurkat competitor (C) cells. The expression of CD69 on E:C ratios ranging from 100:1 to 1:100 was measured by FACS on pre-activation (left panels) and post-activation (right panels) mixtures.
doi:10.1371/journal.pone.0007174.g005

through the circulatory and lymphatic systems and extravasate actively towards the site of tissue damage. We could select tumor-specific T cells as consequence of a process of extravasation, mediated by cellular adhesion molecules, and of a process of retention and activation, mediated by the CIR.

Materials and Methods

Cells and culture conditions

293T cells (human embryo kidney epithelia; CRL-11268), HeLa cells (human cervix carcinoma; CCL-2), HT-1080 cells (human fibrosarcoma; CCL-121), MKN45 cells (human stomach adenocarcinoma; JCRB-0254), and MDA-MB231 cells (human breast adenocarcinoma; HTB-26) were grown in DMEM supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated FCS, (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), referred as to DMEM complete medium (DCM). Jurkat clone E6-1 (TIB-152) cells were maintained in RPMI-1640 (Invitrogen Life Technologies) supplemented with heat inactivated 10% FCS, referred as to RPMI complete medium (RCM). All of these cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). HeLa^{CEA} cells [23] were grown in RCM supplemented with 750 µg/ml G418 (Invitrogen Life Technologies). All cell lines were routinely screened for the absence of mycoplasma

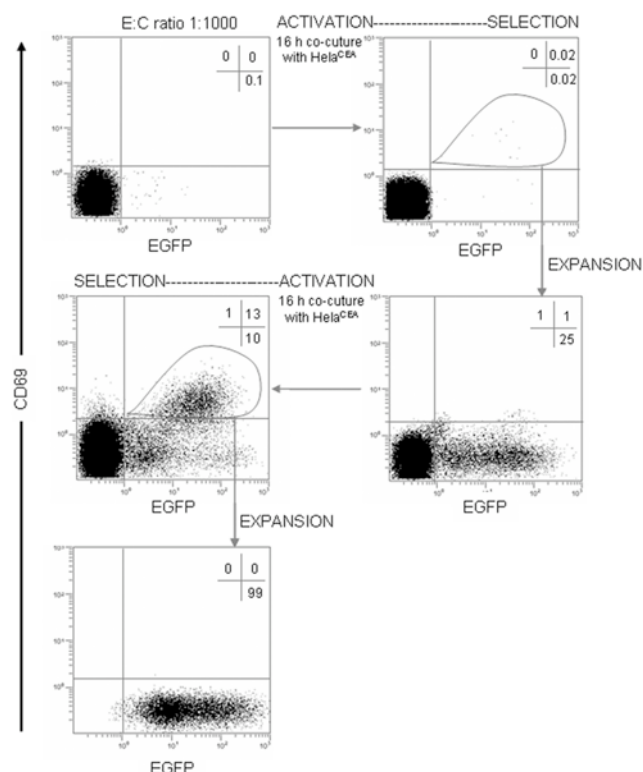


Figure 6. Selection of CIR-activated T cells. Jurkat^{CEA-CIR-EGFP} effector (E) cells and CIR-negative Jurkat competitor (C) cells at a E:C mixing ratio 1:1000 were stimulated with CEA-positive target cells for 16 hours and further sorted on the basis of EGFP and CD69 expression. After a period of cell expansion the activation/selection cycle was repeated.
doi:10.1371/journal.pone.0007174.g006

contamination by PCR using the Mycoplasma Plus TM Primer Set (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA).

Hapten modification of target cells

HeLa cells were extensively washed in PBS, counted, and adjusted to a concentration of 10^7 /mL. A fresh 50 mg/ml solution of NIP-CAP-Osu (succinimide ester of 3-nitro-4-hydroxy-5-iodophenylacetic acid spaced with caproic acid) (Sigma Biosciences, St. Louis MO, USA) in dry dimethylformamide was added to the cell suspension to give a final concentration of 2.5 µg/mL. The cells were incubated for 1 hour at 37°C and then washed three times with 15 mL of cold PBS supplemented with 10% FCS.

Antibodies and reagents

The monoclonal antibodies (mAbs) used included: M2 (anti-FLAG, Sigma Biosciences); 9E10 (anti-c-myc, Abcam, Cambridge, UK), C6G9 (anti-human CD66e/CEA, Sigma Biosciences); BD1690 (anti-HIV p24, Abcam); SPVT3b (anti-human CD3, Zymed, San Francisco, CA, USA) and BG5 (biotinylated anti-human IL-2, Endogen, Woburn, MA, USA). For direct staining, the PE-conjugated FN50 mAb (anti-human CD69, BD Biosciences, San José, CA, USA) was used. The polyclonal antibodies used included: rabbit anti-human IL2 (Endogen), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (Fc specific; Sigma Biosciences); PE-conjugated goat F(ab')₂ fragment anti-mouse IgG (Fcγ Fragment Specific, Jackson Immuno Research, Newmarket, UK); and biotinylated goat anti-HIV p24 (Abcam). Streptavidin-HRP polymer, human IL-2, and human

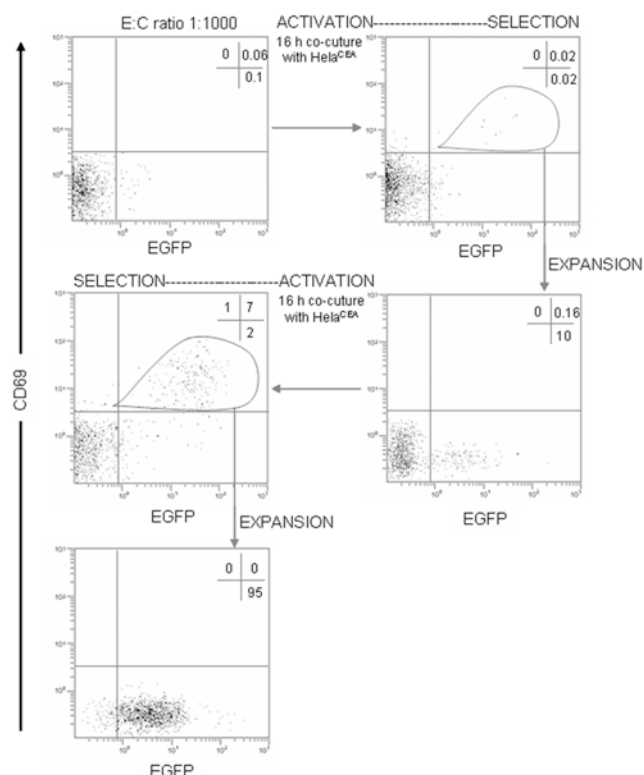


Figure 7. Selection of CIR-activated T cells. Jurkat^{CEA-CIR-EGFP} effector (E) cells and CIR-positive Jurkat^{NIP-CIR} competitor (C) cells at a E:C mixing ratio 1:1000 were stimulated with CEA-positive target cells for 16 hours and further sorted on the basis of EGFP and CD69 expression. After a period of cell expansion the activation/selection cycle was repeated.
doi:10.1371/journal.pone.0007174.g007

CEA were from Sigma Biosciences and HIV-p24 core protein was from Jena Bioscience GmbH (Jena, Germany).

Vector construction and preparation of lentiviral vector stocks

The HIV-derived four-plasmid system was kindly provided by D. Trono (Department of Microbiology and Molecular Medicine, University of Geneva, Switzerland). The transfer vector pRRL-IRES-EGFP contains a cytomegalovirus (CMV) promoter that drives an enhanced-green fluorescent protein (EGFP) expression cassette [24]. To construct the vector pRRL-FLAG α CEA-TCR ζ -IRES-EGFP, the plasmid pVAC. α NIP-TCR ζ was digested with NotI and XbaI to remove a PstI site and religated to form pVAC. α NIP-TCR ζ -Not/Xba in which an oligonucleotide carrying the FLAG sequence (Table 1, oligonucleotides 1 and 2) was introduced between XmaI and PstI to generate the plasmid pVAC.FLAG α NIP-TCR ζ -Not/Xba. The coding sequence was restored by inserting the HindIII/BstEII fragment from plasmid pVAC.FLAG α NIP-TCR ζ -Not/Xba into the HindIII/BstEII digested backbone of plasmid pVAC. α NIP-TCR ζ rendering the plasmid pVAC.FLAG α NIP-TCR ζ . The MFE-23 scFv gene (α CEA) was PCR amplified from pVAC. α CEA-TCR ζ with primers 3 and 4 (Table 1) and the sequence was verified using primers 5 and 6. The NheI/NotI-cleaved PCR fragment was ligated into the NheI/NotI digested backbone of plasmid pVAC.FLAG α NIP-TCR ζ to obtain the plasmid pVAC.FLAG α CEA-TCR ζ . To aid cloning, a NotI site was removed from pRRL-IRES-EGFP by digestion using NotI,

blunting and religation (pRRL-IRES-EGFP^{NotKO}). The FLA-G α CEA-TCR ζ coding sequence was PCR amplified from plasmid pVAC.FLAG α CEA-TCR ζ with primers 7 and 8 (Table 1), digested with BglII and SalI and subcloned into the BamHI/XhoI-digested backbone of the plasmid pRRL-IRES-EGFP^{NotKO}, obtaining the vector pRRL.FLAG α CEA-TCR ζ -IRES-EGFP (called from now pRRL-CIR-IRES-EGFP). Lentiviral particles (ACEA-CIR-EGFP and EGFP) were produced by cotransfection of 293T cells by calcium phosphate precipitation as described previously [24].

Determination of vector titers

An ELISA directed against the p24 capsid protein was performed for titrating the physical particles (PP). PP number was in the range of 1×10^7 – 1×10^8 PP/ml in both lentiviral vector preparations (ACEA-CIR-EGFP and EGFP). Biological titration was performed as previously described [16]. The infective particles (transducing units, TU/ml) were 4×10^7 TU/ml for the lentivirus ACEA-CIR-EGFP and 2×10^7 TU/ml for the lentivirus EGFP.

Genetic modification of human T cells

Exponentially growing Jurkat cells (1×10^5) were incubated overnight in 96-well plates with lentiviral stocks (α CEA-CIR-EGFP or EGFP) at different multiplicities of infection (MOI), ranging from 0.25 to 10 in a final volume of 200 μ l of their appropriate medium. The cells were washed and further cultured for 48 h. Jurkat cells were transfected with the expression vector pCEP4/ α NIPCD3 ζ [16], using Superfect (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and selected in RCM with 400 μ g/ml hygromycin B (Invitrogen Life Technologies). Cells were analyzed for expression of EGFP and CIR (α CEA or α NIP) by FACS.

Flow cytometry

For phenotypic analysis cells were incubated with appropriate dilutions of PE-conjugated mAbs or PE-conjugated isotype negative control for 30 min at 4°C. The expression of CEACAM5 (CEA) on HeLa, HeLa^{CEA}, HT1080, MDA-MB-231 and MKN45 cells was studied as previously described [25]. Cell-surface expression of amino-terminal FLAG-tagged CIR (α CEA-CIR) was evaluated after incubation of cells with anti-FLAG mAb followed by incubation with PE-conjugated goat F(ab')₂ anti-mouse IgG. Cell-surface expression of α -NIP-CIR was evaluated using a FITC-conjugated goat anti-serum to mouse λ -chain (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL; USA). The relative amount of NIP bound to hapten-modified HeLa cells (HeLa^{NIP}) was estimated by indirect immunofluorescence using saturating amounts of a purified B1.8 scFv antibody fragment (LAV-17), anti-c-myc mAb and a PE-conjugated goat F(ab')₂ fragment anti-mouse IgG. All samples were analyzed using an EPICS XL flow cytometer (Beckman Coulter).

T-cell activation and selection

Non-transduced Jurkat, Jurkat^{CEA-CIR-EGFP} or Jurkat^{EGFP} cells (10^5 /well) were incubated with plastic immobilized CEA (1 μ g/well) or anti-CD3 mAb (1 μ g/well) in round-bottom 96-well plates (BD Biosciences). For small-scale co-culture assays, CIR-positive (Jurkat^{CEA-CIR-EGFP} or Jurkat^{NIP-CIR}), CIR-negative (Jurkat or Jurkat^{EGFP}), or mixtures of both effector T cells (5×10^4 /well) were incubated with different types of target cells, at various effector to target ratios. The plates were incubated at 37°C in 5% CO₂. After

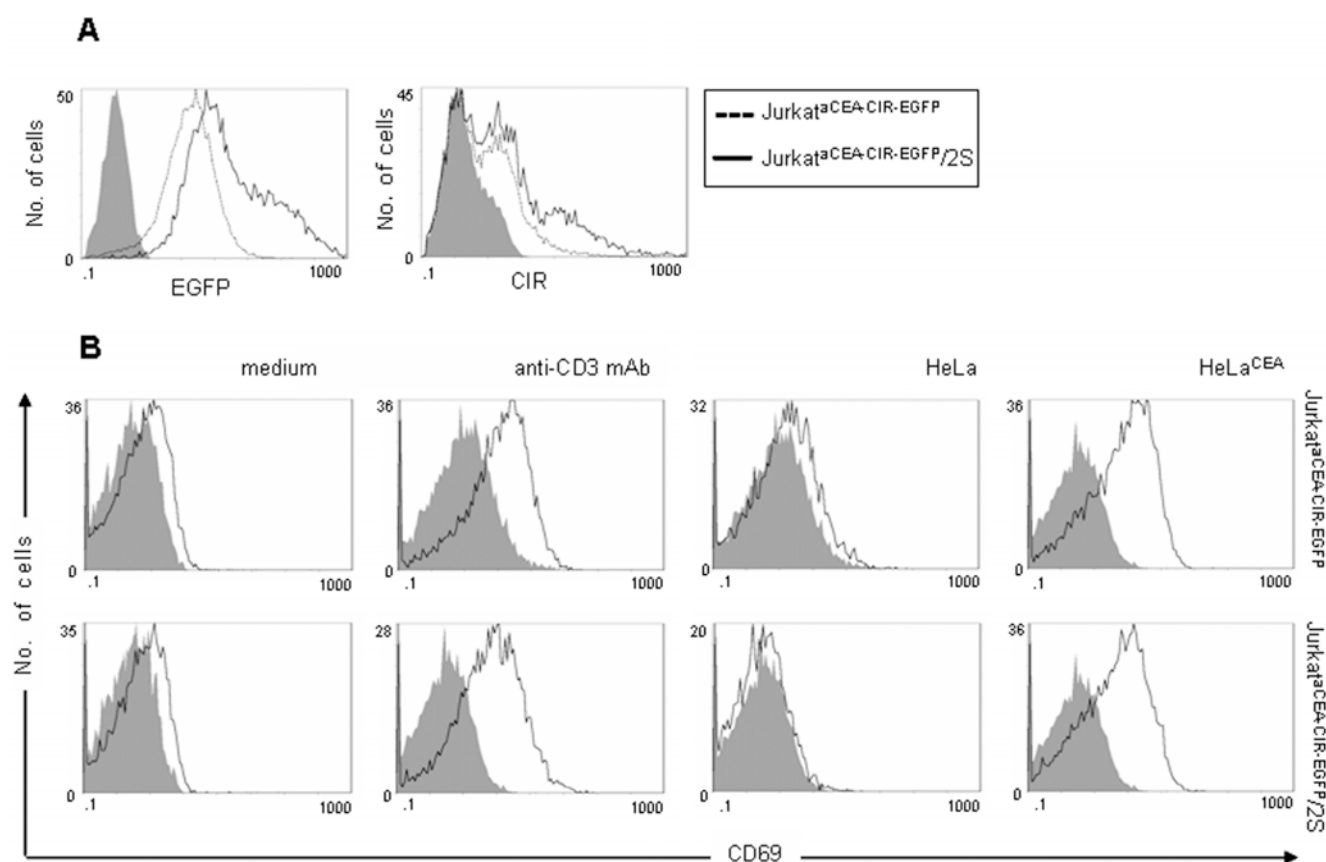


Figure 8. Phenotypic and functional characterization of selected Jurkat^{CEA-CIR-EGFP} cells. (A) Comparative analysis of EGFP and cell surface CIR expression of the initial (Jurkat^{CEA-CIR-EGFP}) and the selected (Jurkat^{CEA-CIR-EGFP/2S}) cell population after two rounds of activation/selection on CEA-positive target cells. (B) Comparative analysis of CD69 expression by Jurkat^{CEA-CIR-EGFP} and Jurkat^{CEA-CIR-EGFP/2S} cell populations after stimulation either with immobilized anti-CD3 mAb or target cells (E:T = 1:1; HeLa or HeLa^{CEA}). doi:10.1371/journal.pone.0007174.g008

16 h or 40 h, cells were collected and the surface expression of CD69 examined by FACS analysis. Supernatants were harvested and assayed for IL-2 activity by ELISA.

For medium-scale co-cultures, CIR-positive (Jurkat^{CEA-CIR-EGFP} or Jurkat^{NIP-CIR}), CIR-negative (Jurkat), or mixtures of both effector (Jurkat^{CEA-CIR-EGFP}; Jurkat or Jurkat^{CEA-CIR-EGFP}; Jurkat^{NIP-CIR}), T cells (3×10^7) were incubated on HeLa or HeLa^{CEA}

monolayers at a 1:1 ratio. After 16 h, cells were harvested with EDTA (Sigma Biosciences), washed, and then Jurkat cells isolated by density-gradient centrifugation. Viable cell counts were determined by trypan blue exclusion. The resultant cells were stained with PE-conjugated anti-CD69 mAb and EGFP⁺CD69⁺ populations further isolated by FACS using a FACSVantage cell sorter (BD Biosciences).

Table 1. Oligonucleotide sequences^a.

Name	Sequence (5'-3')
1	CCGGGGGCCCACTCCGACTACAAGACGATGACGACAAGGCTAGCCAGGTGCAGCTGCA
2	GCTGCACCTGGCTAGCCTTGTCTCATCTGCTTTGTAGTCGGAGTGGGCCC
3	GCTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCT
4	CTCTGTAGCGGCCGCCGTTT
5	CAGGAAACAGCTATGAC
6	TAAACGACGGCCAG
7	ACAGATCTATGGACTGGACCTGGAGGGT
8	AAATGTCGACTTATTAGCGACGAGGGGGCAG

^aSequences of the various oligonucleotides applied for the construction of the vectors, and subsequent verification of vector sequences.

doi:10.1371/journal.pone.0007174.t001

Molecular characterization

Total RNA was extracted from unselected and selected Jurkat α ^{CEA-CIR-EGFP} cells with the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). cDNA synthesis was performed with cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The anti-CEA scFv was PCR amplified with primers 4 and 7, and sequenced with primers 5 and 6 (Table 1).

References

1. Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 14:228 (4705): 1315–1317.
2. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12: 433–455.
3. Urban JH, Schneider RM, Compton M, Finger C, Cichutek K, et al. (2005) Selection of functional human antibodies from retroviral display libraries. *Nucleic Acids Res* 33: e35.
4. Hoogenboom HR (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 23: 1105–1116.
5. Buchholz CJ, Peng KW, Morling FJ, Zhang J, Cosset FL, et al. (1998) In vivo selection of protease cleavage sites from retrovirus display libraries. *Nat Biotechnol* 16: 951–954.
6. Khare PD, Rosales AG, Bailey KR, Russell SJ, Federspiel MJ (2003) Epitope selection from an uncensored peptide library displayed on avian leukosis virus. *Virology* 315: 313–321.
7. Russell SJ, Hawkins RE, Winter G (1993) Retroviral vectors displaying functional antibody fragments. *Nucleic Acids Res* 21: 1081–1085.
8. Beerli RR, Bauer M, Buser RB, Gwerder M, Muntwiler S, et al. (2008) Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 14336–14341.
9. Ho M, Nagata S, Pastan I (2006) Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9637–9642.
10. Taube R, Zhu Q, Xu C, Diaz-Griffero F, Sui J, et al. (2008) Lentivirus display: stable expression of human antibodies on the surface of human cells and virus particles. *PLoS ONE* 3: e3181.
11. Wolkowicz R, Jager GC, Nolan GP (2005) A random peptide library fused to CCR5 for selection of mimetopes expressed on the mammalian cell surface via retroviral vectors. *J Biol Chem* 280: 15195–15201.
12. Gross G, Waks T, Eshhar Z (1989) Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 10024–10028.
13. Alvarez-Vallina L (2001) Genetic approaches for antigen-selective cell therapy. *Curr Gene Ther* 1: 385–397.
14. Sanz L, Blanco B, Alvarez-Vallina L (2004) Antibodies and gene therapy: teaching old ‘magic bullets’ new tricks. *Trends Immunol* 25: 85–91.
15. Chester KA, Begent RH, Robson L, Keep P, Pedley RB, et al. (1994) Phage libraries for generation of clinically useful antibodies. *Lancet* 343: 455–456.
16. Alvarez-Vallina L, Hawkins RE (1996) Antigen-specific targeting of CD28-mediated T cell co-stimulation using chimeric single-chain antibody variable fragment-CD28 receptors. *Eur J Immunol* 26: 2304–2309.
17. Alvarez-Vallina L, Yañez R, Blanco B, Gil M, Russell SJ (2000) Pharmacologic suppression of target cell recognition by engineered T cells expressing chimeric T-cell receptors. *Cancer Gene Ther* 7: 526–529.
18. Finney HM, Lawson AD, Bebbington CR, Weir AN (1998) Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol* 161: 2791–2797.
19. Paillard F (1998) Bacteriophage: tools toward a cell-targeted delivery. *Hum Gene Ther* 9: 2307–2308.
20. Pizzato M, Marlow SA, Blair ED, Takeuchi Y (1999) Initial binding of murine leukemia virus particles to cells does not require specific Env-receptor interaction. *J Virol* 73: 8599–8611.
21. Alemany R, Balague C, Curiel DT (2000) Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 18: 723–727.
22. Zhang L, Giraudo E, Hoffman JA, Hanahan D, Ruoslahti E (2006) Lymphatic zip codes in premalignant lesions and tumors. *Cancer Res* 66: 5696–5706.
23. Hefta LJ, Chen FS, Ronk M, Sauter SL, Sarin V, et al. (1992) Expression of carcinoembryonic antigen and its predicted immunoglobulin-like domains in HeLa cells for epitope analysis. *Cancer Res* 52: 5647–5655.
24. Compton M, Blanco B, Serrano F, Cuesta AM, Sanz L, et al. (2007) Inhibition of tumor growth in vivo by in situ secretion of bispecific anti-CEA \times anti-CD3 diabodies from lentivirally transduced human lymphocytes. *Cancer Gene Ther* 14: 380–388.
25. Blanco B, Holliger P, Alvarez-Vallina L (2002) Autocrine costimulation: tumor-specific CD28-mediated costimulation of T cells by in situ production of a bifunctional B7-anti-CEA diabody fusion protein. *Cancer Gene Ther* 9: 275–281.

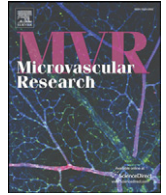
Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LAV. Performed the experiments: VAC DSM MC. Analyzed the data: VAC DSM MC LS LAV. Wrote the paper: VAC DSM LS LAV.



Contents lists available at ScienceDirect

Microvascular Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymvre

Regular Article

Engineered human tumor xenografts with functional human vascular networks

Vanesa Alonso-Camino^a, Patricia Santos-Valle^a, Maria Carmen Ispizua^b,
Laura Sanz^{a,*}, Luís Álvarez-Vallina^{a,*}

^a Molecular Immunology Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid, Spain^b Radiophysics Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 1 October 2010

Available online xxxx

Keywords:

Tumor

Angiogenesis

Engineered vessels

Mouse model

Molecular imaging

ABSTRACT

Animal models of human tumor angiogenesis would have multiple applications. However, they are extremely difficult to standardize. In this work, we tried to generate human tumor xenografts containing a human vascular bed in immunodeficient mice by subcutaneous co-implantation of matrigel-embedded human endothelial cells (EC), human mesenchymal stem cells (MSC) as a source of mural cells and HT1080 human fibrosarcoma cells. Unfortunately, in this context human EC were rapidly substituted by their murine counterparts, and by day 16 post-implantation human CD34 positive cells were hardly detectable in intratumoral vessels. In an attempt to inhibit host EC colonization of human xenografts and promote human EC grafting, we investigated the effect of radiation prior to implantation on the vascularization and growth of tumor xenografts. Nude mice underwent either localized (implantation area) or sublethal whole-body exposure to radiation. Localized radiation inhibited both human and murine neovascularization, and even the tumor growth rate was remarkably decreased when compared to control unirradiated mice and sublethally whole-body irradiated mice. Interestingly, numerous human vessels were detectable in sublethally irradiated mice at day 30, with murine EC only overpassing human EC when spontaneous hematopoietic reconstitution has taken place. This observation strongly suggests the implication of bone marrow-derived murine endothelial precursors in tumor neovascularization. In summary, we have established a model of human tumor neovascularization that is amenable to both the study of molecular aspects in the angiogenic process and the evaluation of potential new antiangiogenic drugs.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Angiogenesis, the sprouting of new capillaries from pre-existing blood vessels, plays a key role in tumor growth and spreading (Carmeliet, 2005), and its inhibition is a promising strategy for cancer treatment (Ferrara and Kerbel, 2005). The idea that tumors could be starved to death by inhibiting their neovascularization was first proposed more than thirty years ago by Judah Folkman (Gimbrone et al., 1972). Many antiangiogenic agents are now in clinical trials, and the main strategies include: blocking growth factor activity; inhibiting extracellular matrix (ECM) interactions; directly targeting endothelial cells (EC); and upregulating endogenous inhibitors. The approval by the FDA in 2004 of the anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) monoclonal antibody bevacizumab as a first-line treatment for

metastatic colorectal cancer has provided a critical proof of principle for this therapeutic approach (Ferrara et al., 2004).

Angiogenesis is a multistep process implying complex molecular and cellular interactions that cannot be recapitulated *in vitro*. Because of this, animal models are essential for the study of the angiogenic process and validation of therapeutic targets. Unfortunately, the promising results obtained in animal models have not always been reproduced in humans (Sanz and Alvarez-Vallina, 2003), probably due to the fact that they are not real models of human tumor angiogenesis or they are not consistent enough (Norrby, 2006).

Primary tumor xenografts imply the transplantation of human tumor tissue fragments containing the original vasculature (Morton and Houghton, 2007). However, the fate of ECs embedded in these implants has been scarcely studied. It was recently shown that human renal cell and prostate carcinoma primary xenografts, established from biopsy specimens, contained vessels lined mainly by human endothelial cells one month after implantation in immunodeficient mice (Gray et al., 2004). In contrast, our group has demonstrated that in colorectal cancer human endothelial cells are rapidly substituted by their murine counterparts (nearly 50% by day 10 after implantation) (Sanz et al., 2009).

Subcutaneous implantation of human tumor cells into immunodeficient mice is one of the easiest approaches for investigating tumor

* Corresponding authors. Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Universitario Puerta de Hierro, C/Manuel de Falla 1, 28222, Majadahonda, Madrid, Spain. Álvarez-Vallina is to be contacted at Fax: +34 913160644. Sanz, Fax: +34 911917760.

E-mail addresses: valonso.hpth@salud.madrid.org (V. Alonso-Camino), patricia.santos@salud.madrid.org (P. Santos-Valle), mispizua.hpth@salud.madrid.org (M.C. Ispizua), lsanz.hpth@salud.madrid.org (L. Sanz), lavarezv.hpth@salud.madrid.org (L. Álvarez-Vallina).

growth and testing new therapeutic agents. However, the vascular component of tumors in these experimental models is provided by the murine host, and many antiangiogenic therapies are species-specific. For example, the FDA-approved anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab does not bind mouse VEGF (Ferrara et al., 2004).

Conversely, durable and functional human blood vessels can be engineered in immunodeficient mice after co-implantation of primary human ECs and human mesenchymal stem cells (MSC) (Nör et al., 2001a,b; Skovseth et al., 2002; Enis et al., 2005; Koike et al., 2004; Dong et al., 2007; Sanz et al., 2008) or spheroid-based EC transplantation (Alajati et al., 2008). The neovessels engineered under these conditions were found to be substantially similar to native vessels at both molecular and cellular level (Sanz et al., 2008; Au et al., 2008; Melero-Martin et al., 2007; Melero-Martin et al., 2008) but they still lack the influence of the tumor context.

Here, we demonstrate that subcutaneous co-implantation of human EC, MSC and tumor cells, embedded in Matrigel, into radiation-conditioned immunodeficient mice resulted in the creation of human functional vascular networks inside tumors.

Material and methods

Cells and culture conditions

Human fibrosarcoma cell line HT1080 (ATCC-CCL-121, Rockville, MD, USA) was grown in DMEM supplemented with 10% FBS (Lonza, Walkersville, MD, USA). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), isolated from human umbilical cord veins by collagenase treatment, were kindly provided by M. Feijóo (Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spain) and cultured in EGM-2 medium containing 2% fetal bovine serum and endothelial cell growth supplements (Lonza). Human mesenchymal stem cells (MSC) obtained from bone marrow samples were kindly provided by J.L. Vicario (Centro de Transfusión, Madrid, Spain). MSC were purified, expanded and characterized as previously described (Sanz et al., 2008). Cells were routinely screened for the absence of mycoplasma contamination by PCR using the Mycoplasma Plus TM Primer Set (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA).

Lentiviral construction

A HIV-derived four-plasmid system was kindly provided by D. Trono (Department of Microbiology and Molecular Medicine, University of Geneva, Switzerland). The transfer vector pRRL-Luc-IRES-EGFP was constructed as previously described (Sanz et al., 2008). Lentiviral particles were produced by cotransfection of 293T cells through calcium phosphate precipitation (Compte et al., 2007).

Cell transduction

HUVEC passage 1 in normal growth media were infected overnight with the lentivirus Luc-IRES-EGFP at a final multiplicity of infection (MOI) of 10. Efficiency of transduction, as assessed by flow cytometric analysis of EGFP expression, was $\geq 98\%$. Transgene expression *in vitro* was monitored for more than 50 days. HUVEC^{LucGFP} were used in passages 3–5.

Mice

Five-week-old female athymic nude mice (Hsd: athymic Nude/Nude; Harlan Iberica, Barcelona, Spain) were used for Matrigel plug implantation. All animals were maintained in a sterile environment. Cages, bedding, food and water were autoclaved. Anesthesia was induced by i.p. injection of a combination of ketamine (Ketolar®, Pfizer, New York, NY, USA) and diazepam (Valium®, Roche, Nutley, NJ, USA). All mice were handled in accordance with the guidelines of the

Hospital Universitario Puerta de Hierro Animal Care and Use Committee, based on current Spanish animal-welfare laws (<http://www.boe.es/boe/dias/2007/11/08/pdfs/A45914-45920.pdf>).

Animal irradiation

The general sublethal irradiation was performed with a Theraton 780 Co⁶⁰-ray unit (AECL, Ottawa, Canada) delivering a dose of 400 cGy, 24 h before vascular implant inoculation. For the local irradiation, unanaesthetized mice were immobilized over a polystyrene sheet and a 1.8 cm wide ventral area along the middle-ventral region of mice, approximately 1 cm proximal to the base of the tail was established. The rest of the mice body was protected with a 2 mm layer of lead. Local irradiation was performed with an electron energy of 4 MeV generated by a linear accelerator (SL18 LINAC, Elekta, Stockholm, Sweden) delivering a 20 Gy total dose of irradiation at a dose rate of 400 UM/min. The distance from electron source to the target was of 100 cm. An 8 mm polystyrene solid water-equivalent layer was placed over the mice to establish the 100% dose of irradiation at the mice surface. The dose at 0.5 cm depth in mice body was of 85%. Consequently, the output dose of irradiation by the dorsal region of the mice body was around 0.5% of total dose. The tumors were implanted in the pre-irradiated site 5 days after irradiation.

Abdominal wall implants

HT1080 tumor cells (3×10^5), a mixture of HUVEC^{LucGFP} (3×10^5) and MSC (7.5×10^4), or a mixture of HT1080 tumor cells (3×10^5), HUVEC^{LucGFP} (3×10^5) and MSC (7.5×10^4) were suspended in 200 μ l of growth factor reduced basement membrane matrix (Matrigel, BD Biosciences) and inoculated subcutaneously in the ventral area of nude mice, as described (Sanz et al., 2008). All batches of Matrigel were adjusted to 8 mg/ml by addition of PBS and supplemented with heparin (128 U/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), human VEGF (50 ng/ml) and human bFGF (150 ng/ml) (both from PeproTech, London, UK). Tumor volumes were determined at various time-points using the formula: $\text{width}^2 \times \text{length} \times 0.52$.

In vivo bioluminescence imaging

Mice were imaged using the high-resolution charge-coupled-device (CCD) cooled digital camera ORCA-2BT (Hamamatsu Photonics France, Massy, France), and Wasabi software (Hamamatsu Photonics). D-luciferin potassium salt (Promega) was dissolved in PBS at a concentration of 17.5 mg/ml. Animals were injected i.p. with 125 mg/kg (150–200 μ l) D-luciferin 10 min prior to imaging. Bioluminescence imaging (BLI) was collected with 1 min integration time and pseudocolor representations of light intensity were superimposed over the grayscale reference image acquired at low light (exposure time 20 ms). An average of 6 kinetic BLI acquisitions was collected after substrate injection to confirm a peak of photon emission. For quantification of the detected light, regions of interest were drawn and the light emitted from each region was recorded by recording the total number of photons per minute (total flux) after background subtraction.

Histology and immunohistochemical study

At different time-points after implantation (10, 16 and 21 days for the first group and 15, 20 and 30 days for the second group) mice were sacrificed, and the tumors were removed, fixed overnight in 10% phosphate-buffered formalin (pH 7.0) for approximately 20 h, dehydrated and paraffin-embedded. For tissue evaluation, paraffin blocks were sectioned serially, deparaffinized and rehydrated through xylenes and graded alcohol series and stained with hematoxylin and

eosin according to standard protocols. For characterization by immunohistochemical (IHC) analysis, antigen retrieval was achieved by heat treatment in a pressure cooker for 4 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0). Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide in water for 5 min. Human ECs were visualized with a mouse mAb anti-human CD34, clone QBEnd10 (Dako, Glostrup, Denmark) using the Mouse on Mouse (M.O.M.TM) peroxidase kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Standard avidin–biotin complex peroxidase immunohistochemistry staining for mouse CD34 (clone MEC14.7, Immunotools, Friesoythe, Germany) was performed on serial sections with Vectastain[®] ABC kit for rat IgG (Vector Laboratories). As a chromogenic substrate, DAB (Vector Laboratories) was used, followed by hematoxylin counterstaining.

Analysis of blood vessel density

Functional vessels were defined as vessel structures containing erythrocytes. Vascular morphogenesis was quantified by enumerating the functional vessels in four randomly chosen fields per hematoxylin and eosin stained section from 10 sections per mouse and expressing the mean \pm SD obtained for each condition. The Mann–Whitney U-test was used to compare HT1080 tumors and HT1080 tumor-vascular implants. Two-sided tests were performed, and P values less than 0.05 were considered to be statistically significant. Statistical analyses were implemented by means of SPSS 14.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Four sections per mouse stained with anti-human or anti-mouse CD34 mAbs were first scanned at low magnification (50 \times) to identify vascular “hot spots”. Areas of greatest vessel density were then examined under higher magnification (200 \times) and counted (Vermeulen et al., 2002). Five high power fields (HPF) per section were

examined. Results were expressed as the mean number of microvessels \pm SD per HPF. Brown-staining areas identified by the DAB staining, whether single ECs or clusters of ECs, regardless of the absence or presence of a lumen were counted as individual microvessels.

Results

Establishment of human tumor xenografts with functional human vascular networks

Recent studies showed that a network of human mature blood vessels can be formed by co-implantation of primary human EC and human MSC in immunodeficient mice (Sanz et al., 2008; Au et al., 2008; Melero-Martin et al., 2007, 2008). These vessels were found to be functional, meaning that they were able to anastomose with pre-existing mouse vessels. To determine if we can establish human tumor xenografts containing human functional vessels, a mixture (4:4:1) of HT1080 human fibrosarcoma cells, genetically modified HUVEC expressing luciferase (HUVEC^{LucGFP}) and human MSC (hereafter referred to as tumor-vascular implants) were embedded in Matrigel and inoculated subcutaneously in the ventral area of athymic nude mice. A mixture (4:1) of HUVEC^{LucGFP} and MSC (hereafter referred to as control-vascular implants) was inoculated as a control.

For each mouse, serial BLI measurements were performed after intraperitoneal injection of the luciferase substrate, D-luciferin, starting at day 1 post-inoculation (Fig. 1). At this initial time point, tumor-vascular implants exhibited higher luciferase activity than control-vascular implants. Within the first 7 days after implantation, all mice showed a marked decline in light emission from their

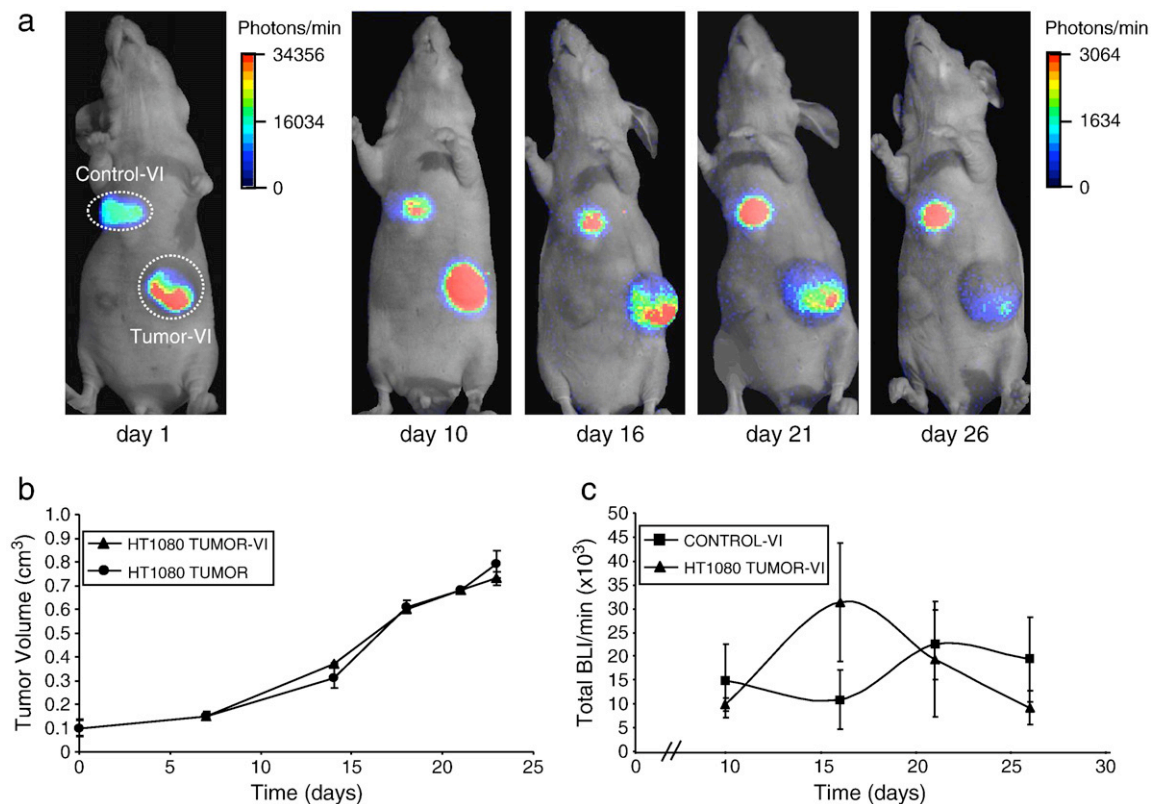


Fig. 1. Non-invasive monitoring of tumor-vascular implants (Tumor-VI) and control-vascular implants (Control-VI) growth and progression. (a) Bioluminescence imaging (BLI) per minute of a representative mouse (total, $n = 3$ mice per group) 1, 10, 16, 21 and 26 days after implantation of vascular implants. (b) Tumor volume measurements of HT1080 cells (2×10^6) injected s.c. into nude mice ($n = 4$ mice per group) with (HT1080 Tumor-VI) or without human ECs and MSCs (HT1080 Tumor). (c) Quantification of BLI signal in Control-VI and HT1080 Tumor-VI ($n = 4$ mice per group). Mean values \pm SD are represented.

implants (data not shown). By day 10 luciferase activity recovery was evident in all implants (Fig. 1a). This temporal silencing of luciferase activity and subsequent recovery can be related to the lapse of time required for the establishment of an incipient vascular functional network (Koike et al., 2004). Photon emission was higher in the tumor-vascular implants than in the control-vascular implants till day 18 (Fig. 1c). From this moment tumor-vascular implants exhibited a decline in the luminescence signal, and showed a clear polarization pattern (Figs. 1a and c). Both processes might be attributed to a dispersion effect due to increasing tumor volume, and/or to the substitution of human EC by their murine counterparts. Interestingly, tumor growth rates were unaffected by the presence of EC and MSC (Fig. 1b).

Vasculature in the xenografts: species-specific vascular labeling

To assess whether the decrease of the luminescence correlated with histological changes, tumor-vascular implants were removed at different time-points after implantation (10, 16 and 21 days), stained with hematoxylin–eosin and evaluated histologically. In all cases, vessel-like structures containing erythrocytes lined by ECs are

detectable in tumor-vascular implants (data not shown). The origin of the vasculature in the xenografts was determined by IHC analysis using anti-human or anti-mouse CD34 mAbs (Figs. 2a–d). The number of vessels positive for each species-specific CD34 mAb was counted (Sanz et al., 2009) in five fields per section and averaged. By day 10, tumor-vascular implants exhibited 40–50% of vessels that expressed primarily human CD34 (Fig. 2e). By day 16, the human vascular component has been almost entirely substituted by the murine vasculature, and by day 21, no staining could be detected with the anti-human CD34 mAb (Fig. 2e and data not shown). Therefore, there is a direct correlation between the decrease in the luminescence signal and the replacement of human EC in the tumor xenograft vascular network.

Effect of radiation on the vascularization and growth of tumor xenografts

In the current study, we designed a number of experiments to evaluate the potential of radiation to inhibit the host-derived neovascularization of human tumor xenografts. In one model, the area of inoculation was locally irradiated. It has been shown that the

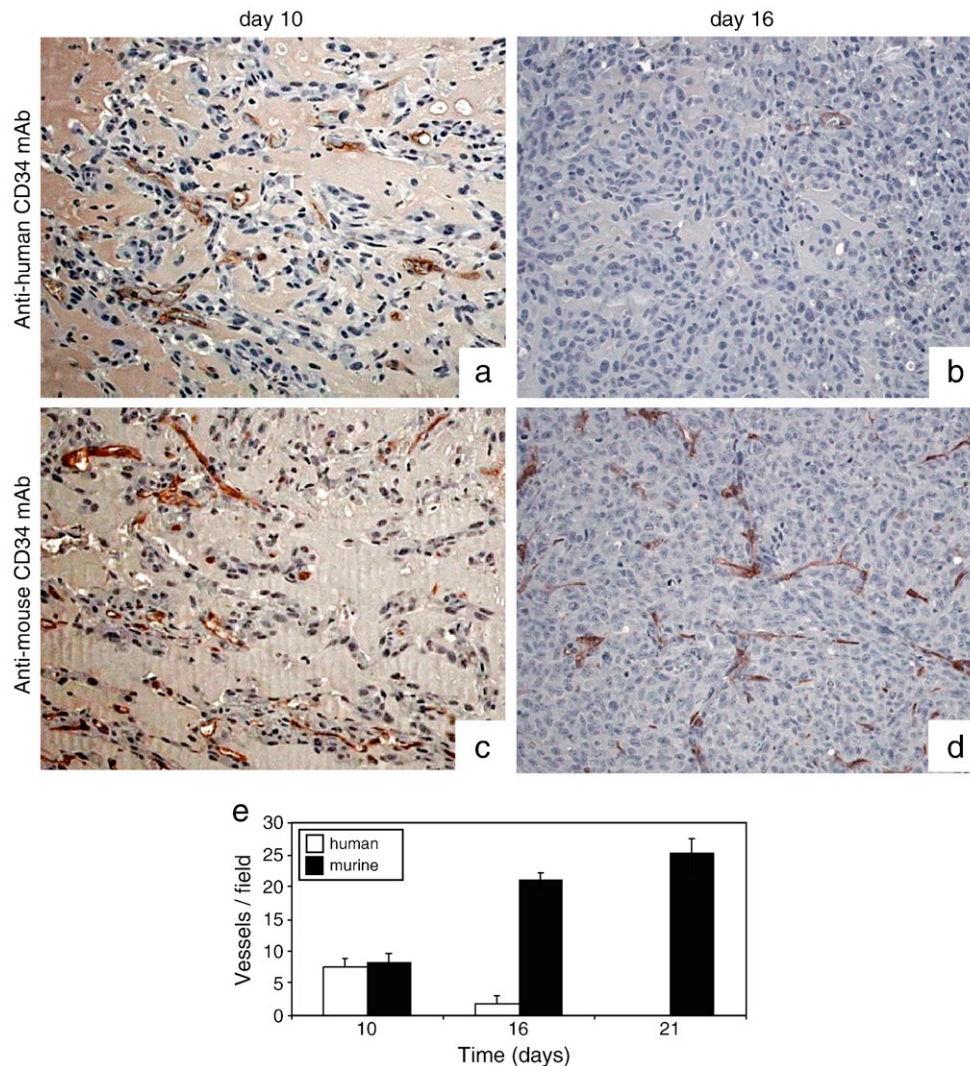


Fig. 2. Histological evaluation of tumor-vascular implants. Immunohistochemical analysis was performed using anti-human CD34 mAb (a, b) or anti-mouse CD34 mAb (c, d). Original magnification, $\times 200$. Quantification of temporal changes in human and murine vessel density in HT1080 Tumor-VI (e) harvested 10, 16 or 21 days after implantation. Five fields per section from four representative sections per mouse ($n = 4$) were examined under original magnification $\times 200$. Mean values \pm SD are represented.

dose of irradiation used (20 Gy) is sufficient to eliminate ECs in the irradiated tissue prior to tumor transplantation and hence abrogate local angiogenesis (Udagawa et al., 2007). In the second model, mice were sublethally, whole-body irradiated. Tumor volumes were measured over time and luciferase activity was monitored by BLI (Fig. 3 and data not shown).

The growth kinetics showed that tumors grew significantly slower in pre-irradiated tissues (Fig. 3a), as reported by others (Milas et al., 1986; Rofstad et al., 2005). Furthermore, HT1080 tumors and HT1080 tumor-vascular implants grown in pre-irradiated tissues showed a very low number of functional blood vessels (considered as those filled with erythrocytes) (Figs. 3b and c). The differences between the locally irradiated group and the sublethally irradiated group or the unirradiated group were statistically significant ($p \leq 0.001$), both in HT1080 tumor-bearing mice (Fig. 3b) and in HT1080 tumor-vascular implant-bearing mice (Fig. 3c). However, sublethal whole-body irradiation has opposite effects on both groups by day 30 after implantation. In mice bearing HT1080 tumors (Fig. 3b) sublethal irradiation decreased intratumoral vessel density compared to control unirradiated group ($p = 0.014$). On the contrary, in mice bearing HT1080 tumor-vascular implants (Fig. 3c) sublethal irradiation increased intratumoral vessel density compared to control unirradiated

ated group ($p = 0.004$). Interestingly, tumor growth and luminescence were higher in sublethally irradiated mice than in control unirradiated mice (Figs. 3a and 4). In the first two weeks after implantation, sublethally irradiated mice showed a progressive increase in light emission from their tumor-vascular implants (Fig. 4). From this moment luciferase activity started to decrease although photon emission was significantly higher in sublethally irradiated mice than in control unirradiated mice even by day 30 (Fig. 4).

As the local pre-irradiation of the tumor implantation sites leads to a dramatic affection of the tumor microenvironment, which causes a very low number of vessels and slow growth of the tumors, this model is inappropriate for the establishment of a vascular network. Therefore, the sublethally irradiated mouse was chosen as a more appropriate model for a more exhaustive analysis.

To further examine the effect of radiation on the nature of vasculature in tumor xenografts, implant sections from control unirradiated mice and sublethally irradiated mice were stained with anti-human or anti-mouse CD34 mAbs. Whereas in control mice human ECs were almost entirely replaced at day 20 by their murine counterparts (Figs. 5a and i), in sublethally irradiated mice tumors showed a functional and well-organized network of human EC-lined

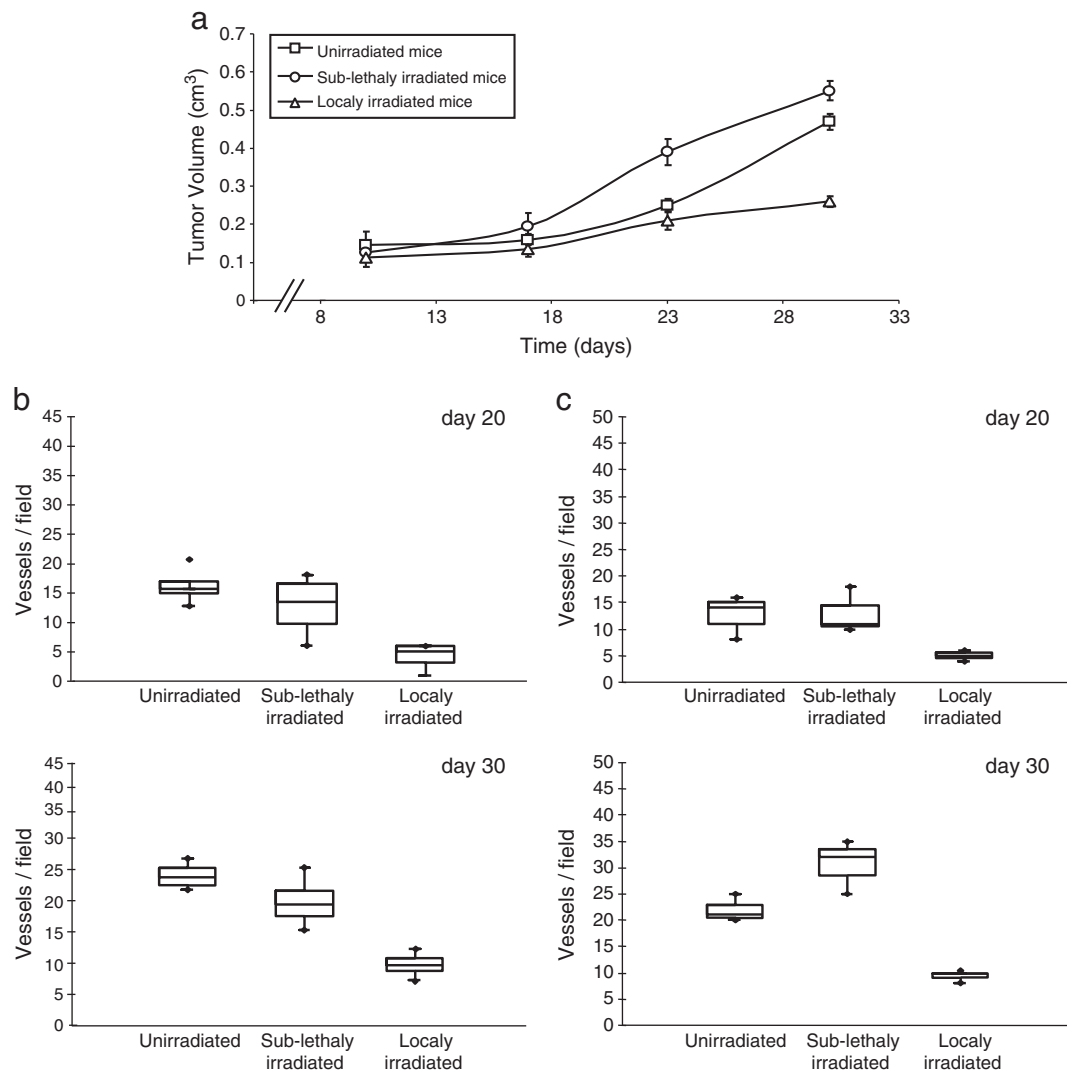


Fig. 3. (a) Effect of local or general sublethal irradiation on tumor-vascular implant growth rate (total, $n = 3$ mice per group). Temporal changes in functional vessel density (mean \pm SD of four randomly chosen fields from 10 different sections per mouse) in HT1080 Tumor (b) and HT1080 Tumor-VI (c) harvested 20 or 30 days after implantation, in local or sublethally irradiated mice and in control unirradiated mice (total, $n = 3$ mice per group).

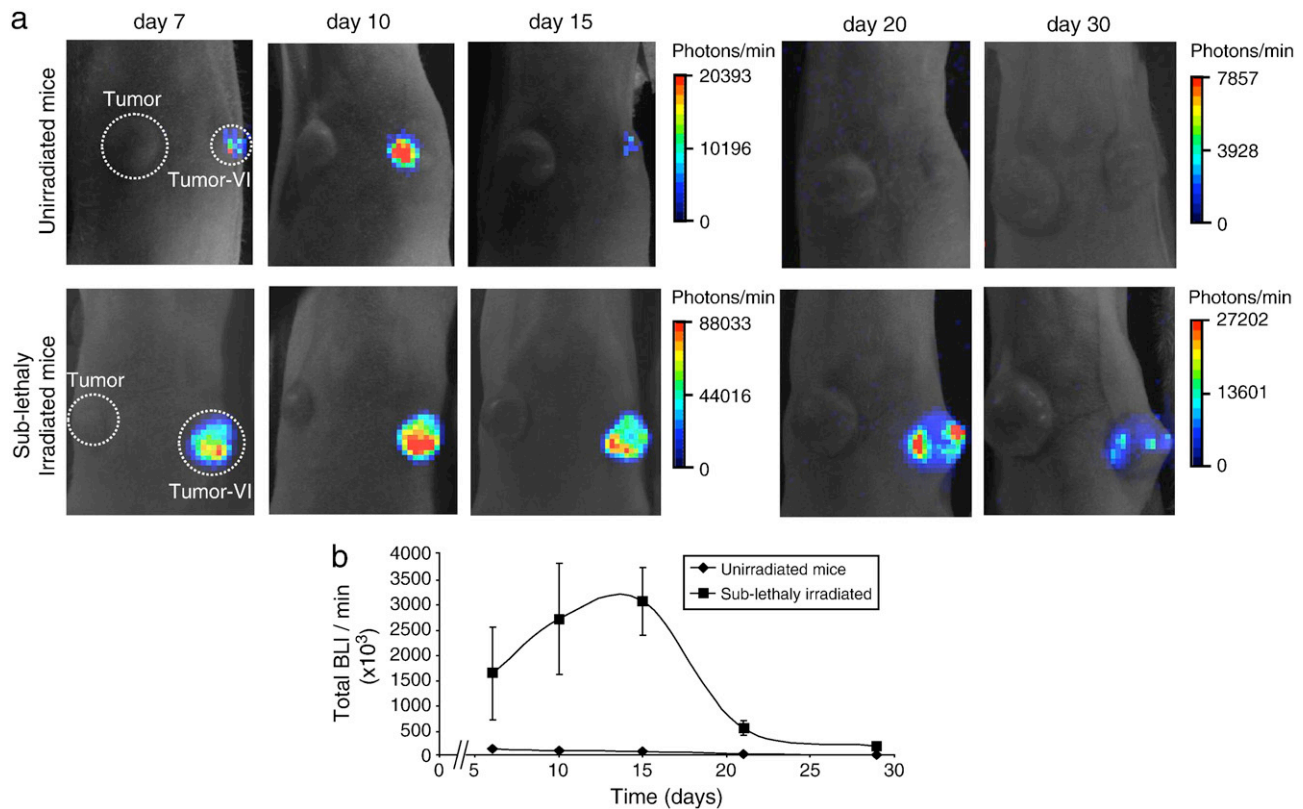


Fig. 4. Effect of sublethal irradiation on BLI signal in mice bearing tumor-vascular implants. (a) BLI of a representative mouse (total, $n = 3$ mice per group) 7, 10, 15, 20 and 30 days after implantation of HT1080 cells with (Tumor-VI) or without human ECs and MSCs (Tumor). (b) Quantification of BLI signal in control unirradiated mice and in sublethally irradiated mice bearing Tumor-VI. Mean values \pm SD are represented.

blood vessels (Figs. 5c and d). Host-derived vessels (50% of the vasculature) were mainly located at the periphery (Fig. 5g), whereas human vessels were distributed rather uniformly throughout the viable tumor areas (Fig. 5c). From this moment murine vessels progressively colonize the xenograft (Fig. 5e). Importantly, tumor-vascular implants presented a significant number of blood vessels (30% of the vasculature) of human origin by day 30 (Figs. 5d and i).

Discussion

Here, we show that co-implantation of human fibrosarcoma HT1080 cells with human primary ECs and human bone marrow-derived MSC into immunodeficient mice resulted in the formation of human tumor xenografts with functional human vascular networks. The presence of human EC-lined lumens containing erythrocytes throughout the human tumor xenografts indicated the vasculogenic potential of ECs and MSCs and the formation of functional anastomoses with the host circulatory system. It has recently been shown that human microvessels can be engineered in immunodeficient mice by the implantation of human primary EC and human MSC seeded on Matrigel. (Sanz et al., 2008; Au et al., 2008; Melero-Martin et al., 2007, 2008). The vessels were stable and functional for more than three months *in vivo* and were found to be substantially similar to native vessels at both molecular and cellular level (Sanz et al., 2008). However, we have assessed that in primary xenografts the human vasculature was rapidly replaced for murine neovessels that end up colonizing the tumor completely. Murine vasculature can arise by proliferation and migration of EC from nearby blood vessels (angiogenesis) or from colonization by circulating endothelial cells and other precursors primarily derived from the bone marrow (vasculogenesis).

In a seminal work Nör et al. (Nör et al., 2001a,b) showed that cotransplantation of human microvascular endothelial cells over-

expressing Bcl-2 and human tumor cells into SCID mice significantly enhanced both the growth of tumors and intratumoral microvascular density. Up-regulation of Bcl-2 expression in tumor microvascular ECs enhanced EC survival and, thus, increased availability of oxygen and nutrients for tumor cells. Moreover, the presence of EC-Bcl-2 in primary tumors significantly enhanced tumor cell metastasis, directly correlated with increased tumor angiogenesis and independently of primary tumor size. However, human EC genetically modified to overexpress Bcl-2 may not constitute an accurate correlate of tumor angiogenesis. In our model, the increase of both EC survival and microvascular density is achieved in a more physiological context through the incorporation of MSCs as a source of mural cells that are pivotal for EC maintenance and maturation (Sanz et al., 2008).

In an attempt to delay the colonization of tumor xenografts by murine vessels, mice were irradiated locally or sublethally (whole-body), without hematopoietic cell transplantation. Radiation is well known to cause damage to ECs (Budach et al., 1993; Dimitrievich et al., 1984) and to inhibit local sprouting (Shinohara et al., 2005; Sholley et al., 1984). In fact, it has been suggested that vessels in tumors implanted in pre-irradiated tissues can only arise from vasculogenesis (Ahn and Brown, 2008). In our model tumor-vascular implants inoculated in locally pre-irradiated tissues grew very slowly and presented an extremely low number of vessels, making it inappropriate for the study of human tumor vasculature. This delay may be due to the fact that local irradiation hampers the connection of *in situ* formed human blood vessels to the host circulatory system and hindered the arrival of murine precursors. The finding that bone marrow-derived endothelial progenitors may participate in neovascularization suggests that radiation could potentially inhibit angiogenesis by suppressing the recruitment of bone marrow-derived endothelial progenitors (Udagawa et al., 2007). In fact, we demonstrate in this work that when tumor-vascular implants are inoculated in whole-body, sublethally irradiated mice the network of human

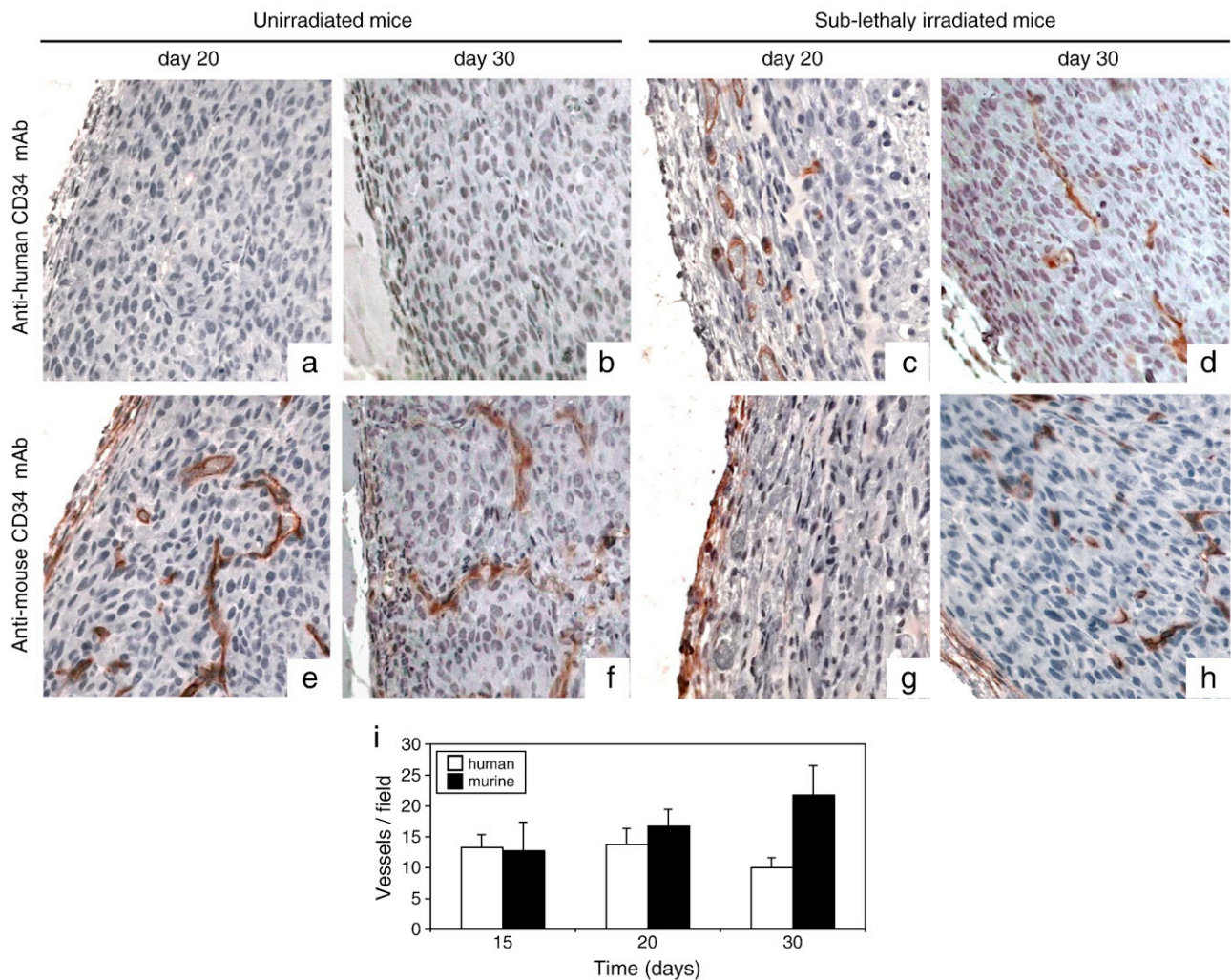


Fig. 5. Immunohistochemical analysis of tumor-vascular implants harvested 20 and 30 days after implantation, in control unirradiated mice or in sublethally irradiated mice. Implant sections were stained with anti-human CD34 mAb (a, b, c and d) or anti-mouse CD34 mAb (e, f, g and h). Original magnification, $\times 400$. (i) Quantification of temporal changes in human and murine vessel density in HT1080 Tumor-VI harvested 15, 20 and 30 days after implantation in the sublethally irradiated group. Five fields per section from four representative sections per mouse were examined under original magnification, $\times 200$. Mean values \pm SD are represented.

blood vessels was stable for at least four weeks. Host-derived vessels were mainly located on the periphery of tumor nodules, whereas human EC-lined blood vessels were distributed rather uniformly throughout the viable tumor areas. In this model, spontaneous hematopoietic reconstitution after irradiation (Charrier et al., 2004) is associated with the onset of tumor colonization by murine vessels (it takes 28–38 days to recover pre-irradiation platelet and neutrophil numbers). This suggests that circulating cells derived from the bone marrow play a crucial role in the neovascularization and growth of tumor xenografts in nude mice. In the absence of colonization by circulating cells, the intratumoral human vascular bed is well preserved.

The notable differences between our *in vivo* model of quiescent vasculature in Matrigel plugs (Sanz et al., 2008) and this *in vivo* model of human tumor vasculature could be due to the nature and structure of tumor blood vessels. Unlike normal blood vessels, tumor vessels are structurally and functionally aberrant (Jain, 2001). Different factors contribute to the formation of tortuous, dilated and sacular blood vessels that are poorly organized and hyperpermeable. It is possible that in a scenario like this the contribution of co-implanted human MSC as a source of mural cells, to stabilize nascent capillary vessels is negligible.

In conclusion, we have developed a model of human tumor vasculature that can be of great utility to study basic aspects of tumor

vascularization, evaluate the efficacy of potential new drugs and identify new targets within the angiogenic process using non-invasively and quantitatively *in vivo* bioluminescent imaging.

Acknowledgments

We thank Isabel Millán for statistical analysis. This study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2008-03233), the Comunidad Autónoma de Madrid (S-BIO-0236-2006), and the European Union (SUDOE-FEDER. IMMUNONET-SOE1/P1/E014) to L.A.-V.; and from the Fondo de Investigación Sanitaria (PI08/90856 and PS09/00227) and the Fundación Investigación Biomédica Hospital Universitario Puerta de Hierro to L.S. V.A.-C. is a predoctoral fellow from the Gobierno Vasco (BFI07.132). P.S.-V. is supported by a fellowship from the Fundación Investigación Biomédica Hospital Universitario Puerta de Hierro.

References

- Ahn, G., Brown, J., 2008. Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. *Cancer Cell* 13 (3), 193–205.
- Alajati, A., et al., 2008. Spheroid-based engineering of a human vasculature in mice. *Nat. Methods* 5 (5), 439–445.

- Au, P., et al., 2008. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood* 111 (9), 4551–4558.
- Budach, W., et al., 1993. Impact of stromal sensitivity on radiation response of tumors. *J. Nat. Cancer Inst.* 85 (12), 988–993.
- Carmeliet, P., 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438 (7070), 932–936.
- Charrier, S., et al., 2004. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme induces radioprotection by preserving murine hematopoietic short-term reconstituting cells. *Blood* 104 (4), 978–985.
- Compte, M., et al., 2007. Inhibition of tumor growth in vivo by in situ secretion of bispecific anti-CEA×anti-CD3 diabodies from lentivirally transduced human lymphocytes. *Cancer Gene Ther.* 14 (4), 380–388.
- Dimitrievich, G., et al., 1984. Radiosensitivity of vascular tissue. I. Differential radiosensitivity of capillaries: a quantitative in vivo study. *Radiat. Res.* 99 (3), 511–535.
- Dong, Z., et al., 2007. Quantification of human angiogenesis in immunodeficient mice using a photon counting-based method. *Biotechniques* 43 (1), 73–77.
- Enis, D., et al., 2005. Induction, differentiation, and remodeling of blood vessels after transplantation of Bcl-2-transduced endothelial cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2), 425–430.
- Ferrara, N., Kerbel, R., 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438 (7070), 967–974.
- Ferrara, N., et al., 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery* 3, 391–400.
- Gimbrone Jr., M.A., et al., 1972. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J. Exp. Med.* 136 (2), 261–276.
- Gray, D., et al., 2004. Short-term human prostate primary xenografts: an in vivo model of human prostate cancer vasculature and angiogenesis. *Cancer Res.* 64 (5), 1712–1721.
- Jain, R., 2001. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat. Med.* 7 (9), 987–989.
- Koike, N., et al., 2004. Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature* 428 (6979), 138–139.
- Melero-Martin, J., et al., 2007. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood* 109 (11), 4761–4768.
- Melero-Martin, J., et al., 2008. Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells. *Circ. Res.* 103 (2), 194–202.
- Milas, L., et al., 1986. Retardation of tumor growth in mice caused by radiation-induced injury of tumor bed stroma: dependency on tumor type. *Cancer Res.* 46 (2), 723–727.
- Morton, C., Houghton, P., 2007. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat. Protoc.* 2 (2), 247–250.
- Nör, J., et al., 2001a. Up-regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth. *Cancer Res.* 61 (5), 2183–2188.
- Nör, J., et al., 2001b. Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab. Invest.* 81 (4), 453–463.
- Norrbj, K., 2006. In vivo models of angiogenesis. *J. Cell Mol. Med.* 10 (3), 588–612.
- Rofstad, E., et al., 2005. The tumor bed effect: increased metastatic dissemination from hypoxia-induced up-regulation of metastasis-promoting gene products. *Cancer Res.* 65 (6), 2387–2396.
- Sanz, L., Alvarez-Vallina, L., 2003. The extracellular matrix: a new turn-of-the-screw for anti-angiogenic strategies. *Trends Mol. Med.* 9 (6), 256–262.
- Sanz, L., et al., 2008. Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels. *Microvasc. Res.* 75 (3), 308–314.
- Sanz, L., et al., 2009. Differential transplantability of human endothelial cells in colorectal cancer and renal cell carcinoma primary xenografts. *Lab. Invest.* 89 (1), 91–97.
- Shinohara, E., et al., 2005. DNA-dependent protein kinase is a molecular target for the development of noncytotoxic radiation-sensitizing drugs. *Cancer Res.* 65 (12), 4987–4992.
- Sholley, M., et al., 1984. Mechanisms of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Lab. Invest.* 51 (6), 624–634.
- Skovseth, D., et al., 2002. Vascular morphogenesis and differentiation after adoptive transfer of human endothelial cells to immunodeficient mice. *Am. J. Pathol.* 160 (5), 1629–1637.
- Udagawa, T., et al., 2007. Chronic suppression of angiogenesis following radiation exposure is independent of hematopoietic reconstitution. *Cancer Res.* 67 (5), 2040–2045.
- Vermeulen, P.B., et al., 2002. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur. J. Cancer* 38, 1564–1579.

“Y luego, cuando ante tí se abran muchos caminos y no sepas cuál recorrer, no te metas en uno cualquiera al azar: siéntate y aguarda. Respira con la confiada profundidad con que respiraste el día en que viniste al mundo, sin permitir que nada te distraiga: aguarda y aguarda más aún. Quédate quieta, en silencio, y escucha a tu corazón. Y cuando te hable, levántate y ve donde él te lleve.”

Donde el corazón te lleve

Susanna Tamaro



No nos damos cuenta de lo importante que es la luz hasta que nos vemos
sumidos en la más profunda oscuridad.

Vanesa Alonso Camino

2011

